

Synthese und strukturelle Untersuchungen an Peptiden und Proteinen mit NMR- und Ultrakurzzeitspektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von

Stephan Rehm

aus
Würzburg

Frankfurt am Main
2009

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. D. Steinhilber
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H. Schwalbe
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. J. Wachtveitl

Tag der Disputation:	21.08.2009
----------------------	------------

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2003 bis April 2009 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- **S. Rehm**, M.O. Lenz, S. Mensch, H. Schwalbe und J. Wachtveitl
Ultrafast Spectroscopy of a Photoswitchable 30-amino acid de novo synthesized peptide
Chemical Physics, 323, 28-35, **2006**.
- **S. Rehm**, S. Han, I. Hassani, A. Sokocevic, H.R.A. Jonker, J.W. Engels und H. Schwalbe
The High Resolution NMR Structure of Parvulostat (Z-2685) from Streptomyces parvulus FH-1641: Comparison with Tendamistat from Streptomyces tendae 4158
ChemBioChem, 10, 119-127, **2009**.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung	1
1.1. Proteine	1
1.2. Ultrakurzzeitspektroskopie	4
1.3. Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	7
2. Azo peptide	13
2.1. Einleitung	13
2.1.1. Photochemische Schalter: Azoverbindungen	13
2.1.1.1. Azobenzol	13
2.1.1.2. AMPB	15
2.1.2. Azo peptide	16
2.2. Material und Methoden	17
2.2.1. Allgemeines	17
2.2.2. Synthese des Azoschalters	17
2.2.2.1. Methode nach Ulysse <i>et al.</i>	18
2.2.2.2. Methode nach Priewisch <i>et al.</i>	21
2.2.3. Festphasensynthese	23
2.2.4. UV/Vis-Messungen	25
2.2.5. Ultrakurzzeitmessungen	25
2.3. Ergebnisse	28
2.3.1. Synthese von AMPB und Azo peptide	28
2.3.2. UV/Vis-Messungen an AMPB und Azo peptide	32
2.3.3. Ultrakurzzeitmessungen an AMPB und dem Azo peptide	34
2.4. Erste Schritte zur photoschaltbaren Häm-Maquette und Ausblick	40
3. Parvulostat	45
3.1. Einleitung	45
3.1.1. α -Amylaseinhibitoren	45
3.1.2. Tendamistat	45
3.1.3. Parvulostat	46

3.2. Material und Methoden	48
3.2.1. Vorbereitung der Proben.....	48
3.2.2. Die NMR-Experimente	49
3.2.3. Auswertung der NMR-Experimente	52
3.2.3.1. Überblick	52
3.2.3.2. Die Resonanzzuordnung.....	53
3.2.3.2.1. Das Proteinrückgrat	53
3.2.3.2.2. Die Proteinseitenketten.....	55
3.2.3.3. Distanzinformation aus NOESY-Spektren	56
3.2.3.4. Torsionswinkelinformation aus skalaren Kopplungskonstanten.....	56
3.2.3.5. Relaxationsmessungen	57
3.2.4. Strukturrechnungen mit ARIA.....	57
3.3. Ergebnisse	59
3.3.1. Die Resonanzzuordnung in Parvulostat.....	59
3.3.1.1. Das Proteinrückgrat von Parvulostat.....	59
3.3.1.2. Die Seitenkettenzuordnung in Parvulostat	63
3.3.2. Sekundärstruktur-Vorhersage in Parvulostat.....	64
3.3.3. Die NOESY-Zuordnung in Parvulostat	67
3.3.4. Skalare Kopplungen in Parvulostat.....	72
3.3.5. Die Rückgratdynamik in Parvulostat.....	73
3.3.6. Berechnung der 3D-Struktur von Parvulostat	76
3.3.7. Diskussion der Struktur und Vergleich mit Tendamistat	81
4. Zusammenfassung	89
4.1. Azopeptide.....	89
4.2. Parvulostat.....	90
5. Appendix	91
6. Literaturverzeichnis	111
<i>Danksagung</i>	
<i>Curriculum vitae</i>	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Faltungstrichters	3
Abbildung 1.2: Zeitskala für molekulare Dynamik und wichtige spektroskopische Methoden.....	4
Abbildung 1.3: Prinzip des Anreg-/Abtast-Experiments	6
Abbildung 1.4: Aufspaltung der Kerne mit halbzahligen Spin im angelegten Magnetfeld	8
Abbildung 2.1: Isomerisierung von Azobenzol zwischen seiner <i>trans</i> - und <i>cis</i> - Konformation.....	13
Abbildung 2.2: Der Azoschalter AMPB in seiner <i>trans</i> -Form.	16
Abbildung 2.3: Schritt 1: Die Synthese der Aminoseite des Azoschalters.....	18
Abbildung 2.4: Schritt 2: Die Synthese der Carboxy-Seite und Zusammenfügung des Azoschalters.....	19
Abbildung 2.5: Schritt 3: Entschützung der Carboxygruppe	20
Abbildung 2.6: Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe von AMPB.....	21
Abbildung 2.7: Synthese des Fmoc-geschützten AMPB nach Priewisch <i>et al.</i>	22
Abbildung 2.8: ¹ H-NMR-Spektrum von 7 in DMSO-d ₆	23
Abbildung 2.9: Prinzip eines Femtosekundspektrometers	26
Abbildung 2.10: Cytochrom bc ₁ -Komplex mit der Untereinheit, die die beiden Helices B und C sowie zwei Häms beinhaltet	29
Abbildung 2.11: Sequenzen der Helices aus Cytochrom bc ₁ und das von Robertson <i>et al.</i> entworfene Peptid	30
Abbildung 2.12: Molekulares Model des synthetisierten <i>trans</i> - und <i>cis</i> - Azopeptids dargestellt mit InisghtII.	31
Abbildung 2.13: Absorptionsspektren des Azopeptids bei kontinuierlicher Belichtung bei 367 nm (<i>trans</i> -> <i>cis</i>).....	32
Abbildung 2.14: Absorptionsänderungen des Azopeptids bei Belichtung mit einer cw-HgXe-Lampe (<i>trans</i> -> <i>cis</i>).....	33
Abbildung 2.15: Absorption bei ausgewählten Wellenlängen als Funktion der Zeit um die thermisch induzierte Rückreaktion (<i>cis</i> -> <i>trans</i>) nach UV- Anregung zu zeigen.....	34
Abbildung 2.16: Transiente Absorptionsänderungen von <i>trans</i> -AMPB und dem <i>trans</i> -Azopeptid nach Photoanregung bei 475 nm (<i>trans</i> -> <i>cis</i>)	35
Abbildung 2.17: Zeitliche Evolution der transienten Absorptionsdifferenz des <i>trans</i> -Azopeptids nach Anregung (<i>trans</i> -> <i>cis</i>) mit einem 475 nm Puls.....	36
Abbildung 2.18: Transiente Absorptionsänderungen von AMPB in Wasser nach Photoanregung bei 475 nm (<i>trans</i> -> <i>cis</i>).	37
Abbildung 2.19: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen des Azopeptids mit AMPB bei einer Wellenlänge von 571 nm (<i>trans</i> -> <i>cis</i>).....	38
Abbildung 2.20: Amplitudenspektren der multiexponentiellen globalen Fit- Analyse für das Azopeptid	39

Abbildung 2.21: Zeitabhängige Absorptionsspektren des (S-geschützten) Azopeptids, des Häm, sowie der einer Mischung der beiden	42
Abbildung 3.1: Parvulustatgen.....	47
Abbildung 3.2: Sequenzangleichung von Tendamistat und Parvulustat	47
Abbildung 3.3: ^1H , ^{15}N -HSQC's bei 37 °C und einer Parvulustat-Konzentration von 1 mM bzw. 0,7 mM	49
Abbildung 3.4: 1D Protonen-Spektrum von Parvulustat	50
Abbildung 3.5: Wichtige NMR-Proteinrückgrat-Experimente.....	54
Abbildung 3.6: HCCH-TOCSY-Experiment.....	55
Abbildung 3.7: Oben: 600 MHz ^1H - ^{15}N HSQC von Parvulustat; unten: 1D Protonen-Spektrum von Parvulustat.....	60
Abbildung 3.8: Die $[\omega_1(^1\text{H}), \omega_3(^1\text{H})]$ „Streifen“ für die Aminosäuren V6-F13 aus dem HNCACB-Spektrum und dem CBCACONH-Spektrum.....	62
Abbildung 3.9: Die $[\omega_1(^1\text{H}), \omega_3(^1\text{H})]$ „Streifen“ für die H_α -Diagonalsignale der Aminosäuren V6-Y12 aus dem HCCH-TOCSY Spektrum.....	64
Abbildung 3.10: Darstellung der kombinierten Abweichung der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats von den „random coil“-Werten.....	65
Abbildung 3.11: Vergleich der β -Faltblätter in Tendamistat und Parvulustat in der Literatur und Procheck mit den an Parvulustat durchgeführten H/D- Austausch-Experimenten	66
Abbildung 3.12: „Streifen“ aus dem ^{15}N -NOESY-HSQC der Aminosäuren 27-33 aus Parvulustat.....	68
Abbildung 3.13: ^1H - ^1H -NOESY in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$: 9/1	69
Abbildung 3.14: ^1H - ^1H -NOESY in 100% D_2O	70
Abbildung 3.15: NOE-Kontaktkarte der zwei β -Faltblätter von Parvulustat;.....	71
Abbildung 3.16: $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungen von Parvulustat	73
Abbildung 3.17: $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -hetNOE von Parvulustat	74
Abbildung 3.18: ^{15}N R_2/R_1 -Verhältnisse von Parvulustat	74
Abbildung 3.19: Ordnungsparameter von Parvulustat.....	75
Abbildung 3.20: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Rückgrat- Standardabweichung (RMSD) für jede Aminosäure ausgehend vom Mittelwert	77
Abbildung 3.21: Darstellung des Rückgrats eines Strukturbündels (20) für Parvulustat.....	80
Abbildung 3.22: Überlagerung des Parvulustat-Rückgrat-Strukturbündels mit dem Tendamistat-Rückgrat-Strukturbündel.....	81
Abbildung 3.23: Links: das Innere von Parvulustat von beiden Seiten des Proteins gesehen; Mitte: Ladungsverteilung des kompletten Proteins; rechts: Rückgratbanddarstellung von Parvulustat	83
Abbildung 3.24: Präsentation der Seitenketten-Seitenketten-NOEs der Aminosäure-Seitenketten	84
Abbildung 3.25: Blick auf das Protein-Rückgrat des zweiten β -Faltblatts von Tendamistat und Parvulustat	85

Abbildung 3.26: (A) Oberflächenpräsentation von Tendamistat; (B)	
Oberflächenpotential für die freie Form von Tendamistat und (C) die	
gebundene Form, (D) Oberflächenpräsentation der Parvulostat-Struktur; (E)	
Oberflächenpotential für Parvulostat.	87
Abbildung 5. 1: Ensemble des Ramachandran Plot von Parvulostat der	
Aminosäuren 8-71	103
Abbildung 5.2: Ramachandranplot der einzelnen Aminosäuren (8-71) von	
Parvulostat für alle 20 Strukturen des Bündels	104
Abbildung 5.3: Eigenschaften der Aminosäuren in der von Parvulostat	
berechneten Struktur	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Überblick über die wichtigsten NMR-Parameter	9
Tabelle 2.1: Die Quantenausbeuten der Photoisomerisierung von Azobenzol ..	15
Tabelle 2.2: Zeitkonstanten erhalten aus der globalen Fit-Analyse der transienten Absorptionsänderungen (<i>trans</i> -> <i>cis</i>) von AMPB und dem Azozeptid	39
Tabelle 3.1: Vergleich von Parvulostat beziehungsweise Tendamistat bezüglich der Identität/Homologie ihrer Aminosäuren	48
Tabelle 3.2: NMR Experimente mit Parvulostat	51
Tabelle 3.3: Statistik für das Ensemble von 20 NMR Strukturen	79
Tabelle 5.1: Chemische Verschiebungen für Parvulostat gemessen bei 318 K ($^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^{13}\text{C}'$, $^1\text{H}_\alpha$ und $^1\text{H}_\beta$).	91
Tabelle 5.2: Chemische Verschiebungen für Parvulostat gemessen bei 318 K ($^1\text{H}_\gamma$, $^{13}\text{C}_\gamma$, $^1\text{H}_\delta$, $^{13}\text{C}_\delta$, $^1\text{H}_\epsilon$, $^1\text{H}_\zeta$, $^{15}\text{N}_\delta$ und $^{15}\text{N}_\zeta$).	94
Tabelle 5.3: Relaxationsdaten: R_1 , R_2 , und deren Verhältnis R_2/R_1	97
Tabelle 5.4: ^3J -Kopplungen, hetNOE und der Ordnungsparameter (S^2).	100

Abkürzungsverzeichnis

ARIA	Ambiguous restraints for iterative assignment
a. u.	arbitrary units
CNS	Crystallography and NMR software
DANI	Diffusion anisotropy
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDT	Ethandithiol
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethylchloroformat
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	N-Hydroxybenzotriazol · H ₂ O
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectroscopy
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
RMSD	Root Mean Square Deviation
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy

1. Einleitung

1.1. Proteine

Proteine sind die wichtigsten Moleküle in der Natur, sie sind für zahllose lebenswichtige Funktionen verantwortlich. Man kann sie als die Arbeitstiere in der Zelle bezeichnen: unter anderem katalysieren sie Reaktionen, transportieren Stoffe, regulieren Ionenkonzentrationen, steuern als Hormone Vorgänge im Körper, dienen als Antikörper der Infektionsabwehr oder erkennen gezielt unterschiedliche Signalstoffe. Besonders faszinierend ist bei diesem extrem breiten Funktionsspektrum von Proteinen, dass sie aus einer Aneinanderreihung von Aminosäuren bestehen, deren Vielfalt sich „nur“ auf 20 verschiedene chemische Bausteine beschränkt.

Um all diese genannten Funktionen und noch mehr ausführen zu können, ist es essentiell, dass sie sich in ihrer korrekt gefalteten Form befinden, also dass die lange Kette aus Aminosäuren (die Primärstruktur des Proteins) eine bestimmte dreidimensionale Form, die Tertiärstruktur, annimmt. Auf diesem Weg wird zunächst die Sekundärstruktur, bestehend aus mehreren Elementen von α -Helices und β -Faltblättern, stabilisiert von Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, wobei die Dihedralwinkel (ϕ und ψ) im Rückgrat der Polypeptidkette bestimmte Werte annehmen. Mehrere dieser Sekundärstrukturelemente bilden dann das komplette Protein in seiner Tertiärstruktur aus, wodurch man diese klassifizieren kann, z. B. als ‚four-helix-bundle‘, ‚sandwich‘, ‚ β -barrel‘, ‚greek-key‘ oder ‚helix-turn-helix‘ (HTH). Zur Ausbildung der Tertiärstruktur gehört auch, dass Kontakte zwischen sequentiell weit entfernten Teilen aufgebaut werden, so wie der Ausbildung der Disulfidbrücken und hydrophober Cluster. Es gibt aber auch Proteine, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen: diese verfügen dann über eine quarternäre Struktur, z. B. das Hämoglobin, ein Tetramer, das aus 2 α - und 2 β -Untereinheiten besteht.

Die große Frage bei der Bildung eines komplexen, eine bestimmte Funktion erfüllenden Proteins aus einer langen Polypeptidkette ist: wie ist es dem Protein möglich in sehr kurzen Zeitspannen während oder nach seiner Synthese am Ribosom sich in die einzig richtige dreidimensionale Form zu bringen, die es dem Protein möglich macht, korrekt zu funktionieren und seine Aufgaben in der Zelle wahrzunehmen?

Bereits 1968 postulierte Cyrus Levinthal [1; 2], dass ein Protein keinesfalls durch zufälliges (bzw. stochastisches) „Durchprobieren“ der verschiedenen Möglichkeiten seine korrekte und funktionstüchtige dreidimensionale Form finden kann (Levinthal-Paradox). Bei einer Annahme von nur zwei verschiedenen Zustandsmöglichkeiten pro Aminosäurerest und einer Proteinlänge von 120 Aminosäuren wären bei einer Zeitspanne von etwa 10^{-13} s für eine Zustandsänderung $4,2 \cdot 10^{15}$ Jahre (schlechtestenfalls) nötig, um das Protein in seiner nativen Form zu erhalten. Da dies nicht der Fall sein kann - manche Proteine falten sich in ihre korrekte Form in Sekundenbruchteilen, während zumindest für theoretische Faltungsmodelle gilt, dass das Herstellen der Tertiärkontakte der limitierende Schritt ist [3] - müssen andere Möglichkeiten der Proteinfaltung in Betracht gezogen werden.

1973 postulierte Christian Anfinsen: „All the information necessary to achieve the native conformation of a protein in a given environment is contained in its amino acid sequence.“ [4] Wenn aber alle nötige Information für die native Struktur eines Proteins in seiner Aminosäuresequenz liegt, folgt daraus eine thermodynamische Kontrolle der Proteinfaltung, also dass das Erreichen der nativen Konformation eines Proteins am Minimum der freien Gibb'schen Energie liegt.

Levinthal hingegen war der Meinung, dass die Proteinfaltung unter kinetischer Kontrolle verläuft, wobei es auch möglich ist, dass das Protein in ein energetisches Minimum läuft, das nicht das globale ist und durch eine Energiebarriere daran gehindert wird aus diesem wieder heraus zu kommen. Durch dieses Hängenbleiben in den „falschen“ Minima können falsch gefaltete Proteine entstehen, die wie auch aggregierte Proteine Mitursache vieler Funktionsstörungen und Krankheiten sind. Beispiele hierfür sind etwa die Alzheimer-Krankheit, die Parkinson-Krankheit, Amyloidose, transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) oder Diabetes (Typ II).

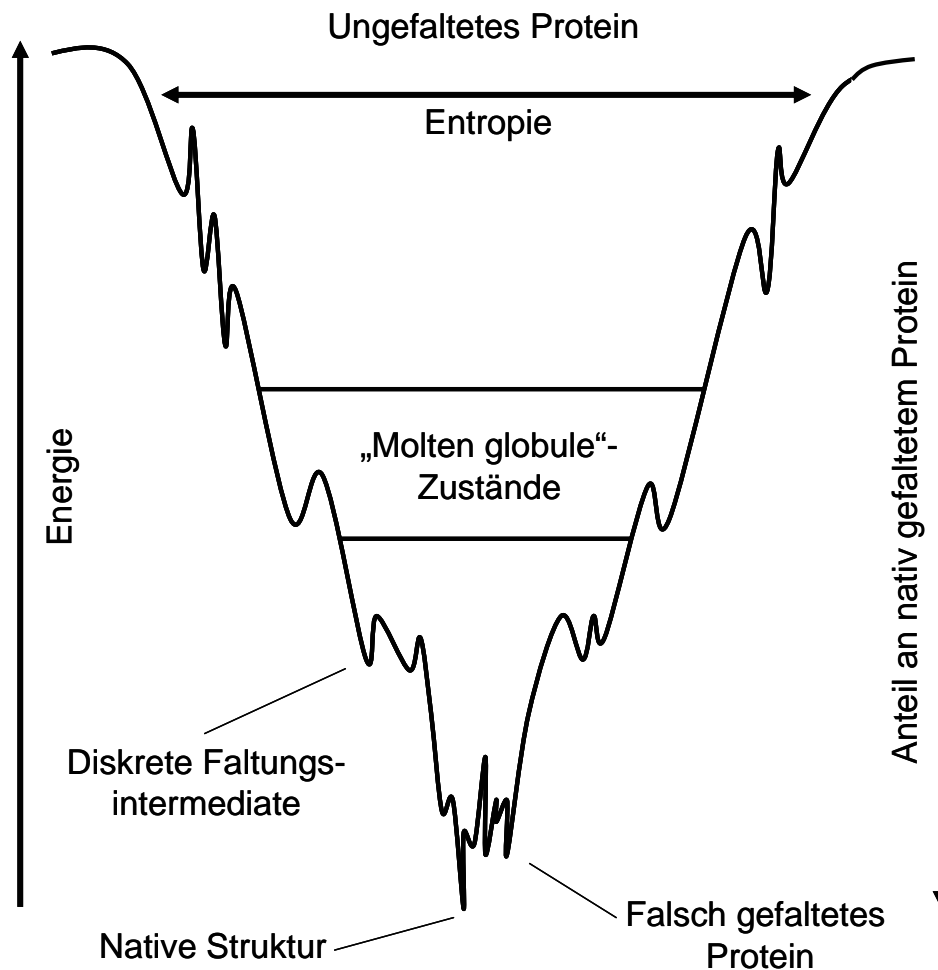


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Faltungstrichters (zweidimensional). Die Breite des Trichters ist ein Maß der Entropie, wohingegen die Tiefe ein Maß für den Energieinhalt darstellt (verändert nach Wolynes *et al.* [5]).

Die Diskussion über die Faltung der Proteine wird nun seit 40 Jahren geführt, und man hat noch keine allgemeingültige Lösung für dieses hochinteressante Verhalten der Proteine gefunden. In dieser Zeit wurde allerdings viel erreicht, da die Proteinforschung aufgrund der interessanten Fragestellung intensiv betrieben wurde, nicht nur um die Funktionsweise, Dynamik und Reaktionen der Proteine, sondern eben auch deren äußere Form und Struktur zu verstehen und nachbilden zu können, um z. B. eines Tages die Form und Eigenschaften von Medikamenten aus der Struktur und Funktion von Proteinen ableiten zu können.

Die für Proteindynamik wesentlichen Zeitskalen sind in Abbildung 1.2 dargestellt. In dieser Arbeit wurden vor allem zwei Techniken benutzt, um Informationen über Struktur und Dynamik von Proteinen und Peptiden zu erfahren: die Ultrakurzzeitspektroskopie und die Kernresonanzspektroskopie

(NMR). Der zeitliche Bereich über den mit diesen Techniken Informationen über Proteine erfasst werden können ist ebenfalls in Abbildung 1.2 markiert.

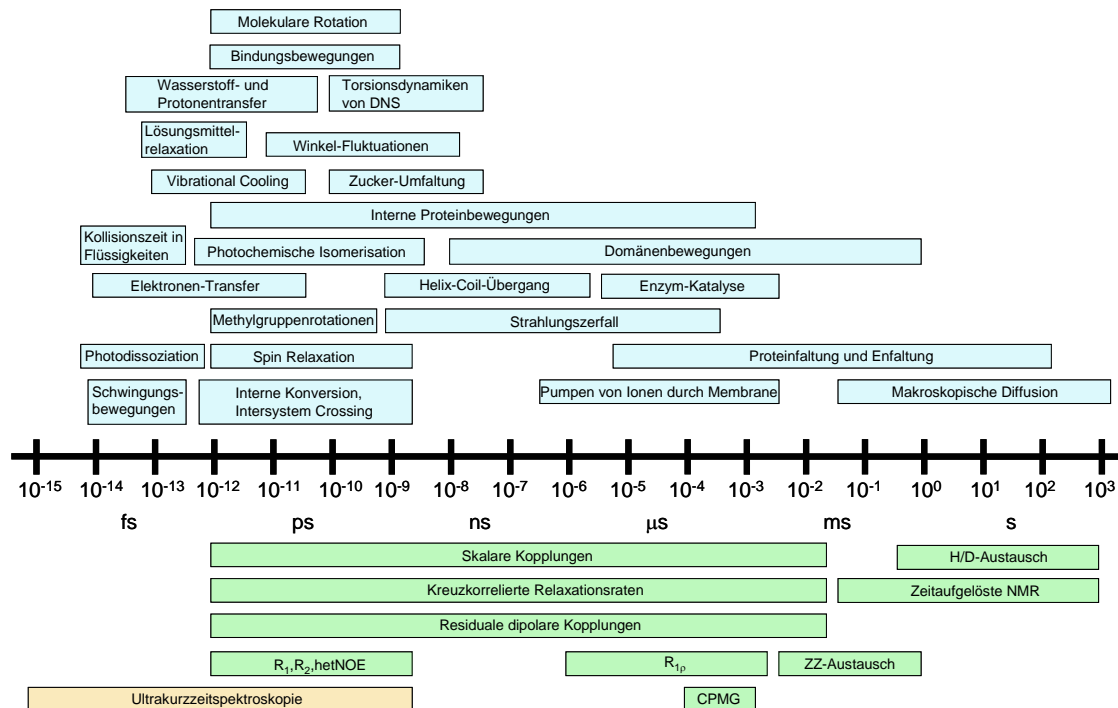


Abbildung 1.2: Zeitskala für molekulare Dynamik (blau) und wichtige spektroskopische Methoden (grün: NMR-Spektroskopie; orange: Ultrakurzzeitspektroskopie), mit deren Hilfe diese Ereignisse beschrieben werden können.

In den nächsten beiden Abschnitten werden diese beiden Techniken, ihre Anwendungen und ihre Bedeutung vorgestellt.

1.2. Ultrakurzzeitspektroskopie

Um verstehen zu können, wie und in welcher Geschwindigkeit Reaktionen von Proteinen ablaufen, ist es nötig, Techniken zu entwickeln, mit denen gemessen werden kann, wie lange ein Prozess dauert, oder warum z. B. manche Reaktionen bevorzugt stattfinden. Fundamentale Schritte des Faltungsprozesses in Proteinen etwa finden innerhalb sehr kurzer Zeiträume (fs – ps) statt und daher ist es nötig sehr kurze Zeiträume auch mit einer ausreichenden Genauigkeit vermessen zu können. Für die Messung von diesen sehr kurzen Zeiträumen (10^{-12} – 10^{-15} s) sind moderne Laser, die eine sehr kurze Pulsdauer besitzen notwendig. Hierbei werden die extrem kurzen Laserpulse

durch optische und quantenmechanische Effekte generiert. In laserinduzierten pH-, Temperatursprung-, Elektrontransfer-, oder Energietransfer-Experimenten wurde bereits gezeigt, dass grundlegende Strukturelemente bereits im Nanosekundenbereich entstehen. [6-18] Die Methode der Anreg-Abtast-Spektroskopie beruht darauf, diese sehr schnellen Prozesse wiederholt zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen und somit, nach der Aufbereitung der Daten, ein Bild der Reaktion zu liefern. Da diese ultraschnellen Prozesse unterhalb einer Nanosekunde nicht mehr mit herkömmlichen Detektoren (bis zu einigen Nanosekunden) erfasst werden können, wird die Zeitauflösung durch Teilen der kurzen Laserpulse und Verzögern des einen Teils erreicht. Durch diese verschiedenen Zeiten (= Weglängen des Impulses) erhält man schließlich die Absorption der Probe als Funktion der Zeit (siehe Abbildung 1.3).

Die Kenntnis der Lichtgeschwindigkeit sowie die Länge der Verzögerungsstrecke vorausgesetzt, lässt sich der zeitliche Unterschied der zwei Impulse berechnen. Beispiele hierfür sind z. B. chemische Reaktionen oder das Abklingen zuvor angeregter Zustände in Molekülen. Weiterhin werden ultrakurzzeitspektroskopische Messverfahren auch in Kerr-Gate-Messungen [19], Vier-Wellen-Mischen [20], Fluoreszenz-Aufkonversion [21] und 2D-IR-Spektroskopie [22] verwendet.

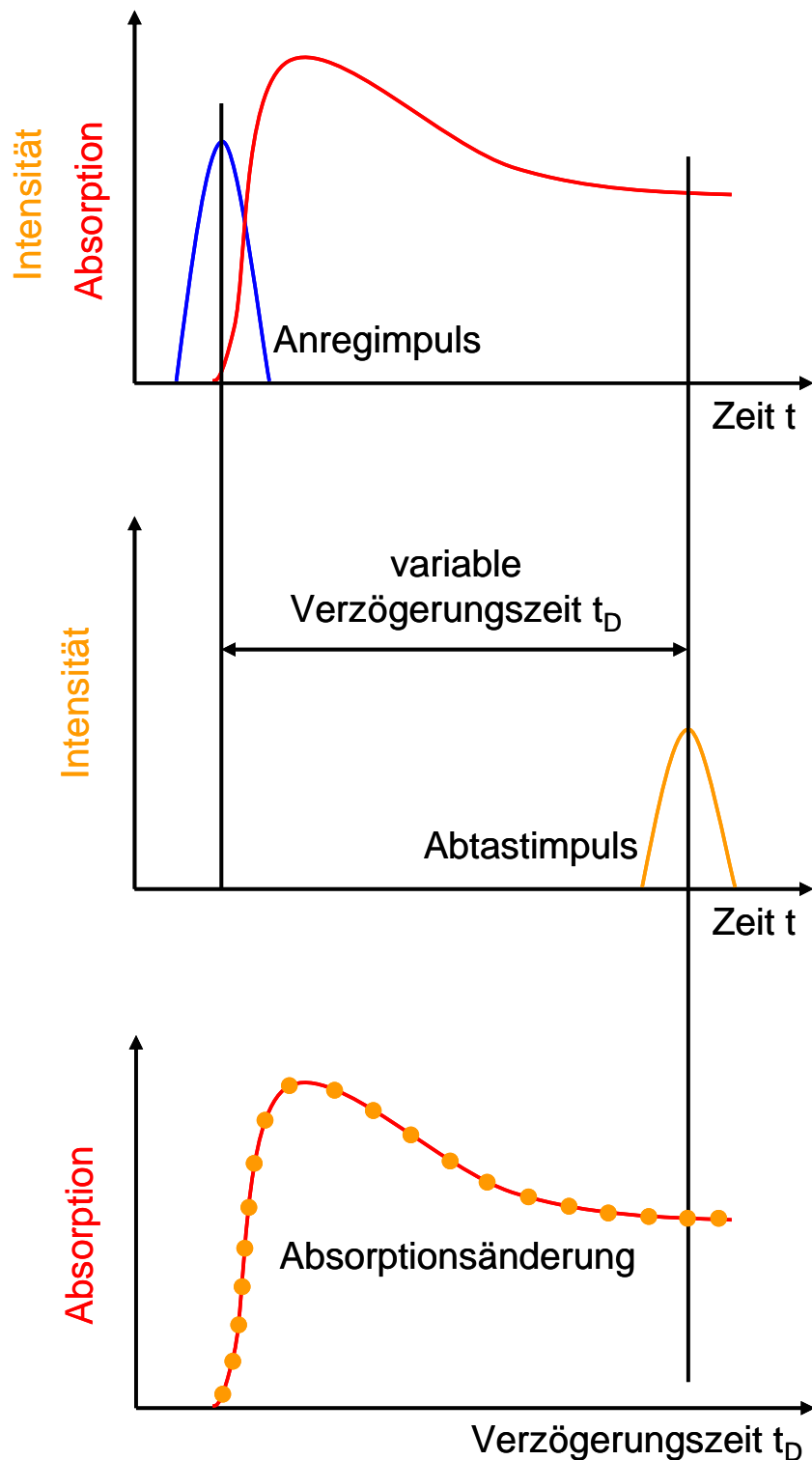


Abbildung 1.3: Prinzip des Anreg-/Abtast-Experiments; der Lichtimpuls wird in Anreg- und Abtast-Impuls aufgeteilt und die Absorption der Probe aus den Messungen zu verschiedenen Verzögerungszeiten zusammengesetzt (inspiriert durch <http://www.bmo.physik.uni-muenchen.de>).

Während mit der Ultrakurzzeitspektroskopie extrem kurze Zeiträume betrachtet werden, liefert die Kernresonanzspektroskopie (NMR) Informationen

auf langsameren Zeitskalen (siehe Abbildung 1.2). Dafür hat sie sehr viel mehr Möglichkeiten, Dynamik in Proteinen zu untersuchen und besonders auch komplette Strukturen mit atomarer Auflösung zu liefern.

1.3. Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Um Funktionsweisen von Proteinen zu verstehen, will man ein möglichst genaues und differenziertes Bild dieser Moleküle erhalten, durch welche man z. B. sehr genau beschreiben kann, ob die aktiven Zentren eines Proteins sich verändern, während das Protein seine Funktion erfüllt. Hierfür war es unerlässlich, Techniken zu entwickeln, mit denen man die Struktur eines Proteins mit atomarer Auflösung beschreiben kann. Die Technik, mit der bisher die meisten Strukturen von Proteinen aufgeklärt wurden, ist die Röntgenkristallographie. Hier liegt die Beugung von Röntgenstrahlen am Kristallgitter zugrunde, während die Voraussetzung für diese Methode ist, das entsprechende Protein zu kristallisieren. Diese Kristallisation stellt für diese Methode nicht nur den schwierigsten (und manchmal undurchführbaren) Teil dar, es bringt die Proteine auch in einen Zustand, der unter Umständen dem Zustand in ihrer natürlichen Umgebung (also z. B. in der Zelle) nicht sehr ähnlich ist.

In der NMR hingegen wird das Protein in Lösung untersucht, wobei mit Pufferlösungen ein möglichst realer Zustand der zu untersuchenden Moleküle erreicht wird. Gemessen wird letztlich die nukleare Spin-Rückorientierung an einem angelegten magnetischen Feld, meist für Kerne mit Spin $\frac{1}{2}$. Diese existieren in zwei entgegengesetzten Orientierungen, die ohne ein externes Magnetfeld dieselbe Energie haben. Wie in Abbildung 1.4 zu sehen ist, wird bei Anlegen eines Magnetfeldes diese Entartung aufgehoben und die Energielevels der beiden Spins werden in ihre parallele bzw. anti-parallele Orientierung aufgespalten. Für NMR von Proteinen waren als Kerne mit halbzahligem Spin lange hauptsächlich die Protonen (^1H) interessant, aber nach Entwicklung der heteronuklearen Methoden und der Ermöglichung der Isotopenmarkierung der Proteine auch ^{15}N - und ^{13}C -Kerne.

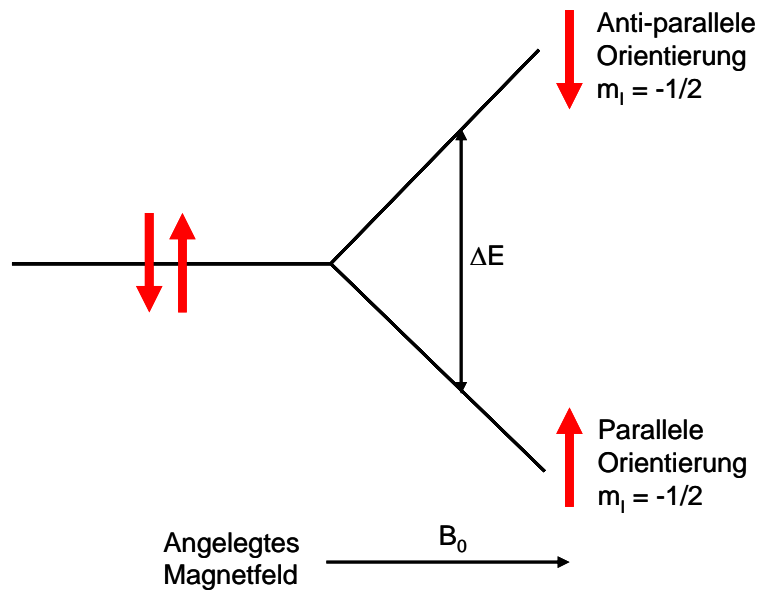


Abbildung 1.4: Aufspaltung der Kerne mit halbzahligen Spin im angelegten Magnetfeld (nach Whitford *et al.* [23]).

Daraus ergibt sich allerdings auch eine weitere Schwierigkeit in der NMR, da die Menge an Protein, sowohl ^{15}N als auch $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiert bereitgestellt werden muss ($\mu\text{M} - \text{mM}$), was meist mit einem erheblichen Aufwand und hohen Kosten verbunden ist. Durch immer ausgefeiltere Techniken, wie z. B. kryogene Probenköpfe und Magneten, die ein immer höheres Feld besitzen, können aber immer geringere Protein-Konzentrationen vermessen werden.

Die Entwicklung der Magneten, die inzwischen über 22 T Feldstärke erreichen (950 MHz, BMRZ, Frankfurt am Main) wurde auch vorangetrieben, um eine geringe Linienbreite und so bessere (Auf-)trennung der einzelnen Signale zu haben. Dies ist besonders bei großen Proteinen, die sowohl ein größere Linienbreite als auch mehr Signale haben, sehr wichtig.

Eine große Herausforderung in der Strukturaufklärung bei Proteinen mittels NMR stellt die Resonanzzuordnung dar: jedes Signal muss seinem Ursprung entsprechend bestimmten Atomen zugeordnet werden. Hierbei war die Entwicklung der heteronuklearen NMR-Methoden von größter Wichtigkeit, da somit dreidimensionale Spektren aufgenommen werden konnten, die die Signale eines Spektrums gut entzerren konnten und viele Probleme, die bezüglich Signalüberlappung entstehen, eliminieren konnten.

Um eine Proteinstruktur mittels NMR zu lösen, werden meist viele verschiedene Parameter bestimmt: essentiell sind die Distanzbeschränkungen (erhalten über NOE's), zusätzlich können auch Torsionswinkel,

Relaxationsdaten und residuale dipolare Kopplungen (RDC's) für die Berechnungen der Struktur benutzt werden. Voraussetzung um die genannten Parameter benutzen zu können ist die Zuordnung der chemischen Verschiebungen, die ihrerseits außerdem noch Informationen bezüglich der Sekundärstruktur des Proteins liefern. Auf die Torsionswinkel ϕ und ψ hingegen kann man schließen, wenn man die skalaren Kopplungskonstanten, genauer die vicinalen ^3J -Kopplungen, bestimmt und mit Hilfe der Karplus-Gleichung [24] eine Beziehung zur Konformation des Rückgrates im Protein herstellen kann. Auf die in dieser Arbeit benutzten Techniken wird in Kapitel 3.2.3. näher eingegangen, eine Zusammenstellung der wichtigsten Parameter für die NMR-Spektroskopie ist in Tabelle 1.1 zu sehen.

Parameter für NMR	Aussage über Proteine
Chemische Verschiebung (ppm)	Mehrere Torsionswinkel: ϕ , φ , ω und χ_1
^nJ -Kopplungen (Hz)	Einzelne Torsionswinkel mit Hilfe der Karplus-Gleichungen
Homonukleare NOEs (a.u.)	Abstände, Abhängigkeit von der Korrelationszeit und Bewegungseigenschaften
Heteronukleare Relaxation (Hz)	Bewegungseigenschaften, Abhängigkeit von τ_c , S^2 und τ_e
Residuale dipolare Kopplungen RDCs (Hz)	Allgemeine Form, Dynamik
H/D-Austausch	Austauschbare Amid-Protonen
Diffuion (m^2/s)	Hydrodynamischer Radius (R_h)
Photo-CIDNP	Zugängliche Trp, Tyr und His

Tabelle 1.1: Überblick über die wichtigsten NMR-Parameter und ihre Aussagen über Proteine (verändert nach Wirmer [25]).

Das Ergebnis dieser Berechnungen besteht in der NMR normalerweise aus einem Ensemble an Strukturen, im Gegensatz zur Röntgenkristallographie, die immer nur eine Struktur liefert. Durch diese „Struktur-Familie“ wird auch gleichzeitig eine Aussage über die Flexibilität der einzelnen Regionen eines Proteins getroffen: je unterschiedlicher einzelne Strukturen an einer bestimmten

Stelle im Protein sind, desto flexibler wird dieser Teil in Lösung sein. Lange Zeit war die Strukturaufklärung in der NMR jedoch auf Proteine mit einer Größe von ~ 20 kDa beschränkt.

Durch immer ausgefeiltere Methoden ist es jedoch inzwischen möglich, auch größere Proteine zu untersuchen: das bisher größte Protein, dessen Struktur durch NMR-Techniken gelöst werden konnte ist das monomere Enzym Malat-Synthase G (MSG), das aus einer Polypeptidkette mit 723 Aminosäuren besteht und 82 kDa aufweist. [26] Aufgrund der Größe des Proteins wurden spezielle Methoden zur Isotopenmarkierung benutzt, um sich des Problems des Überlappens vieler Signale zu entledigen. Es wurden Proben hergestellt, die das Protein mit einem hohen Deuterierungsgrad enthielten. Lediglich für die Methylgruppen von Isoleucin ($\delta 1$), Leucin und Valin wurden selektiv Protonen eingeführt. Dass man sich hier besonders auf die Methylgruppen im Protein konzentriert hat, liegt vor allem an deren Eigenschaften innerhalb des Proteins: die Methylgruppen liegen meist innerhalb der hydrophoben „cluster“ der Proteine und haben hier einen sehr großen Anteil an weit reichenden NOE's, die bei den Berechnungen der Struktur für eine korrekte Faltung des Proteins in seine dreidimensionale Struktur enorm wichtig sind.

Andere Möglichkeiten die immer stärker in Betracht gezogen werden sind neben der Entwicklung der Programme mit denen die Signalzuordnungen durchgeführt werden (CARA [27], CCPN [28; 29]), möglichst automatisierte Zuordnungen der Signale. Bei diesen Automatisierungen ist zwischen drei verschiedenen Arten zu unterscheiden: das Signal-Finden, das Zuweisen der spezifischen Resonanzen zu den Signalen, sowie die Signalzuordnung in NOE-Spektren. [30] Während für die meisten die Automatisierungsmechanismen gilt, dass sie zuverlässig und ohne menschliche Kontrolle meist nur für Modell-Systeme (z. B. Ubiquitin) arbeiten, gibt es mit z. B. FLYA [31] bereits Algorithmen, die mit dem Ansatz arbeiten, eine komplette 3D-Strukturvorhersage für Proteine aus einem Set von multidimensionalen Spektren ohne weiteres menschliches Zutun zu erreichen.

Generell ist jedoch zu sagen, dass trotz aller Bemühungen und neuartiger Programme für eine korrekte Strukturvorhersage immer noch die Erfahrung und das geschulte Auge eines NMR-Spektroskopikers benötigt wird, da die wenigsten Proteine sich so perfekt vermessen lassen, dass man die Spektren nur von einem Programm analysieren lassen kann.

Viele Proteine müssen, wenn sie sich in ihrer korrekt gefalteten Struktur befinden, noch flexible Teile besitzen, die für ihre Funktion essentiell sind, z. B. um einen Liganden zu binden. Mit der NMR-Spektroskopie hat man die Möglichkeit, viele verschiedene dynamische Prozesse eines Proteins zu untersuchen (siehe Abbildung 1.2). Breit genutzt werden bei der Strukturanalyse von Proteinen, wie auch in dieser Arbeit, besonders die longitudinalen ($R_1 = 1/T_1$) und transversalen ($R_2 = 1/T_2$) ^{15}N -Relaxationsdaten sowie die heteronuklearen ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -Het-NOEs. Es konnte gezeigt werden, dass die zeitabhängigen Variationen im Magnetfeld ein Spinsystem (hier das Spinpaar ^1H - ^{15}N), das mit Radiofrequenzpulsen gestört wurde, wieder in sein Gleichgewicht zurück relaxieren lassen kann. Da diese Fluktuationen des lokalen Magnetfeldes leicht auf interne Bewegungen reagieren, bieten die Messungen von NMR-Relaxationsraten einen direkten Zugang auf dynamische Parameter des Proteins.

Die longitudinalen Relaxationsdaten zeigen die Wiedererlangung der ^{15}N -Z-Magnetisierung zu seiner Gleichgewichtsposition, während die transversalen Relaxationsdaten den Zerfall der Magnetisierung orthogonal zur Z-Achse seines Gleichgewichtswertes darstellen. Bei den heteronuklearen ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -Het-NOEs werden Informationen aus Messungen mit und ohne vorheriger Sättigung der Protonen benutzt, deren Quotient aus den Volumina der Signale ein Maß für den Transfer an Magnetisierung von ^{15}N und ^1H ist:

$$\text{HetNOE} = I_{\text{NOE}} / I_{\text{NO NOE}}$$

Trägt man diesen Quotienten nun gegen die Aminosäuresequenz auf, erhält man eine Kurve, deren niedrigere Werte flexible Regionen im Protein andeuten. Unter Umständen existieren für sehr flexible Regionen (z. B. der C- oder N-Terminus des Proteins) auch negative Werte.

Insgesamt ist zu sagen, dass die Technik der NMR-Spektroskopie über die Jahre, unter anderem auch durch die Entwicklung der Computertechnik, an Bedeutung vor allem gegenüber der Röntgenkristallographie gewonnen hat. Nicht nur, weil inzwischen immer größere Systeme dank größerer Magneten untersucht werden können, sondern auch weil die Breite der Untersuchungen und damit die Menge an Informationen die man über ein (Biomakro)-Molekül in Erfahrung bringen kann viel größer ist.

2. Azopeptide

2.1. Einleitung

2.1.1. Photochemische Schalter: Azoverbindungen

2.1.1.1. Azobenzol

Azobenzol (Diphenyldiazen) ist ein schon sehr lange bekanntes und auch schon sehr gut untersuchtes Molekül, es ist die Stammsubstanz der Azoverbindungen, bestehend aus zwei Phenylgruppen und der Azogruppe –N=N–. Azoverbindungen vereinigen viele Eigenschaften auf sich, die sie in wirtschaftlichen (Herstellung von Farben und Pharmazeutika) wie auch wissenschaftlichen Bereichen sehr interessant machen: neben hoher thermischer Stabilität und relativ geringer Reaktivität ist eine wichtige Eigenschaft, die Ausbildung von zwei stabilen Konformationen, dem *trans*- und dem *cis*-Azobenzol, was den Einsatz des Moleküls als Schalter durch z. B. Lichtinduktion möglich macht.

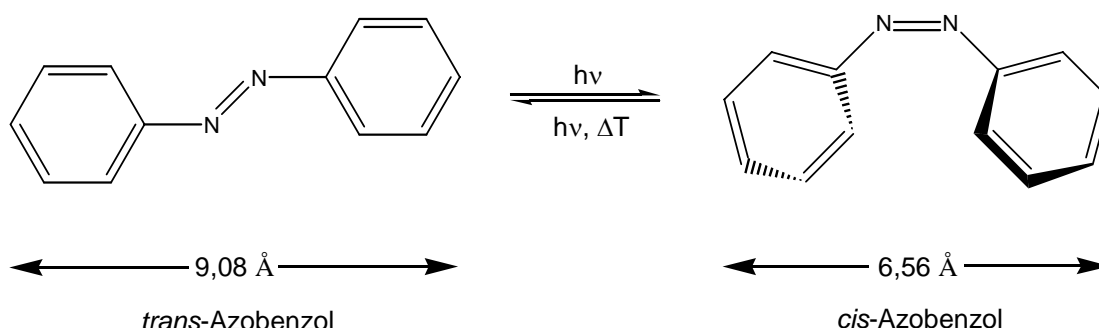


Abbildung 2.1: Isomerisierung von Azobenzol zwischen seiner *trans*- und *cis*-Konformation.

1941 konnte diese Isomerisierung durch Röntgenbeugungsexperimente nachgewiesen werden, [32] nachdem bereits 1938 die reinen *trans*- und *cis*-Formen isoliert werden konnten. [33] Die *trans*-Form ist die thermodynamisch stabilere, die *cis*-Form ein metastabiler Zustand. Der Isomerisierungsmechanismus von Azobenzol ist immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen, drei mögliche Prozesse werden unterschieden: der Inversions-, der Rotations-, und der „Hula-Twist“-Mechanismus. [34-39] Klar hingegen ist, dass die *cis*-Konformation nicht planar

ist, da die beiden Phenylringe sich abstoßen (ein Phenylring dreht sich um 53.3° aus der N=N-C-Ebene heraus [40]), während für die *trans*-Form eine planare oder doch leicht verdrillte Form diskutiert wird. [41] Besonders bedeutungsvoll an dieser Konformationsänderung ist die große Änderung der Ausdehnung des Moleküls sowie die Geschwindigkeit, mit welcher diese stattfindet: beim *trans*->*cis*-Übergang ändert sich die Länge zwischen den beiden *para*-Kohlenstoffen von $9,08 \text{ \AA}$ auf $6,56 \text{ \AA}$ innerhalb von wenigen hundert Femtosekunden. Bei der Isomerisierung wird zunächst ein Photon von einem Molekül absorbiert, welches dadurch in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt wird, den es dann strahlungslos wieder verlässt um auf die Grundzustandspotentialfläche zurückzukehren. Dies kann in zwei verschiedenen Formen geschehen: in der *trans*- oder der *cis*-Form des Azobenzols.

Die Quantenausbeute (Ψ) beschreibt das Verhältnis von isomerisierten zu angeregten Molekülen. Man kann sich leicht vorstellen, dass man mit diesem Molekül relativ große strukturelle Änderungen in mit dem Schalter verbundenen Molekülen erzeugen kann, wenn man die Isomerisierung auslöst. Azobenzol war lange bekannt als Farbstoff, aber erst sein Potential als molekularer Schalter hat zur intensiven Beschäftigung mit diesem Molekül und seinen Derivaten geführt, was sich auch in einer rapide angestiegenen Zahl an Publikationen ab den 1990er Jahren niedergeschlagen hat. [42]

Man kann also sagen, dass Azobenzol sehr gut als reversibler Photoschalter eingesetzt werden kann, da es neben relativ hohen Quantenausbeuten nach Photonenabsorption eine große Änderung in seiner Form erfährt und bereits sehr gut charakterisiert ist. Für die Quantenausbeuten der Photoisomerisierung von Azobenzol in mehreren Lösungsmitteln sind die Werte nach Rau [43] in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Lösungs- mittel	$\pi\pi^*$		$n\pi^*$		Veröffentlicht von
	t -> c	c -> t	t -> c	c -> t	
n-Hexan	0,11	0,27	0,25	0,56	Bortolus <i>et al.</i> [44]
n-Hexan		0,44		0,55	Slampiringue <i>et al.</i> [45]
n-Hexan	0,10	0,44	0,2	0,68	Stegemeyer [46]
n-Hexan	0,10	0,42	0,28	0,55	Ronayette [47]
Ethanol	0,2		0,36	0,45	Birnbaum <i>et al.</i> [48]
Ethanol	0,15	0,24	0,28	0,51	Bortolus <i>et al.</i> [44]
Acetonitril	0,15	0,21	0,31	0,46	Bortolus <i>et al.</i> [44]

Tabelle 2.1: Die Quantenausbeuten Ψ der Photoisomerisierung von Azobenzol in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur nach Rau [43]

Besonders hilfreich ist auch die hohe Geschwindigkeit, mit der die Isomerisation stattfindet, da sich dadurch die Isomerisation relativ leicht von – normalerweise langsameren – Prozessen unterscheiden lässt. An die beiden Phenylringe können eine Vielzahl von funktionellen Gruppen addiert werden, was ein sehr breites Spektrum an Anwendungen zulässt.

2.1.1.2. AMPB

Eine Möglichkeit, Azobenzol zu modifizieren und in größere Systeme einzubauen, besteht darin, es als Aminosäure zu „verkleiden“. Wenn man also jeweils in *para*-Position der beiden Phenylringe eine Amino- und eine Carboxy-Funktion einfügt, erhält man das Schaltermolekül APB ((4-Aminophenyl)azobenzoesäure), das bereits Gegenstand der Forschung in photoschaltbaren Peptiden war. Dies gilt auch für das AMPB ((4-Aminomethyl)phenylazobenzoesäure), bei welchem an beiden *para*-Positionen der Phenylringe des Azobenzols dieselben Funktionalisierungen wie bei APB vorgenommen werden, allerdings zwischen der Aminofunktion und dem Phenylring noch eine Methylengruppe eingebaut ist. Durch diese Erweiterung wird die Konjugation des π -Elektronensystems unterbrochen, was bei der praktischen Anwendung hilfreich ist, da hier nicht wie im APB die $\pi\pi^*$ - und die $n\pi^*$ -Banden überlappen. Einen weiteren synthetischen Vorteil besitzt dieses Molekül außerdem noch: während bei APB noch ein vollständig konjugiertes π -

System die Nucleophilie der Aminogruppe stark verringert, kann durch den eingebauten Spacer das AMPB als mehr oder weniger „normale“ Aminosäure für die Festphasensynthese verwendet werden. [49] Außerdem entspricht AMPB viel besser der Länge der Rückgrate von 2 Aminosäuren als APB, was dazu führt, dass sich beim Austausch derselben im Peptid weniger für das Peptid ändert.

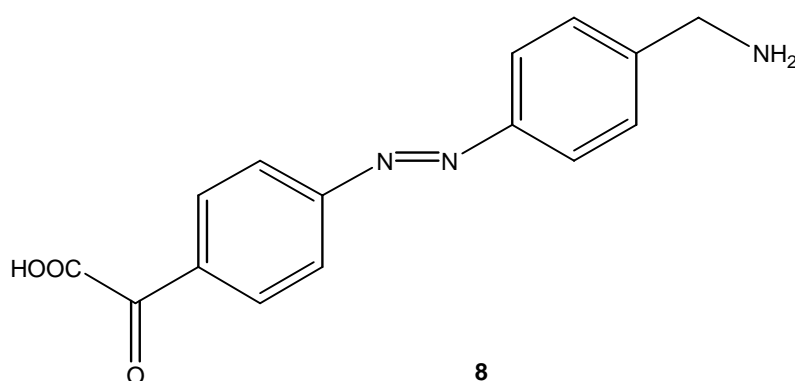


Abbildung 2.2: Der Azoschalter AMPB ((4-Aminomethyl)phenylazobenzoessäure) in seiner *trans*-Form ist als Pseudoaminoäure als Baustein für die Peptidsynthese geeignet.

Bereits existierende Peptide in denen AMPB als Schaltermolekül fungiert wurden bereits publiziert. [50-54]

2.1.2. Azopeptide

Nachdem erkannt worden war, dass sich Reaktionen in Peptiden mit dem schnellen Schalter Azobenzol (nach dessen Derivatisierung) triggern und sich so Konformationsänderungen z. B. in Peptiden photoinduzieren lassen, wurde eine Vielzahl von Ideen verwirklicht. [55; 56]

Herausstechend hierbei sind u. a. die Arbeiten, die sich mit (bi)zyklischen, Nonapeptiden beschäftigen. [57; 58] Hier war die Grundidee, Peptide zu konstruieren, die den Azoschalter in ihrem Rückgrat tragen. Durch eine Zyklisierung der Peptide sollte sich, je nachdem ob der Schalter in *trans*- oder *cis*-Form vorliegt, das Peptid sich zur Helix falten können (*cis*) oder ungefaltet (*trans*) vorliegen.

In einer anderen Idee wurde das Schaltermolekül nicht in das Peptidrückgrat eingebaut, sondern an die Thiolgruppen der Seitenketten von zwei

Cysteinen. [59-61] Auch hier ist das Ziel die Faltung der Aminosäurekette zu einer Helix zu beobachten, nur dass der umzulegende Schalter hier „neben“ dem Peptid liegt und nicht in seinem Rückgrat verankert ist. Durch Variation der Positionen der Cysteine innerhalb des Peptids konnten dann Rückschlüsse auf das Verhalten des Peptids gezogen werden. Ziel dieser Bemühungen ist es, lichtensitive Proteine herzustellen, um die Rollen bestimmter Proteine in lebenden Zellen besser verstehen zu können als das bis jetzt der Fall ist.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Allgemeines

Alle benötigten Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Fluka® bzw. Aldrich® (beide Sigma-Aldrich Chemie GmbH) oder bei Merck KGaA gekauft und waren analytisch rein. H-Leu-2-ClTrt-Harz und die verschiedenen Aminosäuren wurden bei Novabiochem (Schwalbach/Ts., Deutschland) gekauft. Dünnschichtchromatographie-Platten zur Reaktionskontrolle wurden bei Mallinckrodt Baker (Griesheim, Deutschland) gekauft.

Massenspektren wurden entweder auf einem Fisons Instruments VG Platform II ESI-Massenspektrometer oder auf einem Fisons Instruments VG ToFSpec MALDI/TOF-Massenspektrometer gemessen.

Die analytische Umkehrphasen-HPLC wurde auf einem Merck Hitachi System und die präparative Umkehrphasen-HPLC auf einem Bruker LC21 durchgeführt. Es wurde eine Kromasil-100 C18 Säule (5 µm, 20 × 250 mm, MZ-Analysentechnik, Mainz, Deutschland) verwendet, bei einer Flussrate von 1 mL/min (analytisch) bzw. 8 mL/min (präparativ) und einem lineareren Gradienten von CH₃CN/0.1% TFA von 30:70 zu 60:40 in 40 min.

2.2.2. Synthese des Azoschalters

Ziel war es, den Photoschalter AMPB in das Rückgrat eines Peptids einzubauen. Hierfür war es notwendig, den eigentlichen Schalter, also 4-Aminomethyl-Phenylazobenzoessäure, zu modifizieren, um einen Einbau zu ermöglichen. Weiterhin war es nötig, die Aminofunktion dieser Pseudo-Aminosäure mit der Fmoc-Schutzgruppe zu schützen, um AMPB wie eine

normale Aminosäure in der Festphasensynthese verwenden zu können. Hierfür wurde zunächst die Methode nach Ulysse *et al.* [62], später dann die Methode nach Priewisch *et al.* [63] verwendet.

2.2.2.1. Methode nach Ulysse *et al.*

Bei der Methode nach Ulysse *et al.* werden zunächst die beiden funktionellen Gruppen (also die Carbonsäurefunktion, geschützt als *tert*-Butylester, und die Aminofunktion, geschützt durch die Fmoc-Gruppe) eingeführt. Anschließend wird die Azo-Funktion gebildet und danach die Esterfunktion in die freie Säure umgewandelt. Zuletzt wurde noch die Fmoc-Schutzgruppe von AMPB entfernt. Für diese Arbeit wurde diese Methode in einigen Punkten geändert; im Folgenden ist dargestellt, wie der Azoschalter zunächst synthetisiert wurde.

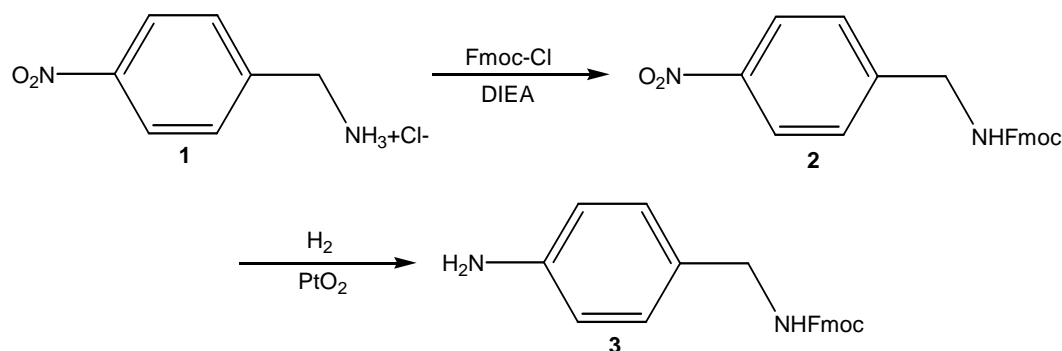


Abbildung 2.3: Schritt 1: Die Synthese der Aminoseite des Azoschalters

Eine Suspension aus 4-Nitrobenzylaminhydrochlorid (**1**) (2,0 g; 10,6 mmol,) in CH₂Cl₂ (200 ml) wird mit Fmoc-Cl (2,8 g; 10,6 mmol) und DIEA (9,1 ml; 53,0 mmol) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Ausbeute: 3,49 g (88 %); ESI-MS: $m/z = 374,65$ [M+H]⁺; M_r = 374,13 (berechnet) für C₂₂H₁₈N₂O₄.

Anschließend wurde **2** unter Argon in 100 ml Methanol gelöst und unter Verwendung von PtO₂ als Katalysator innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur und unter Wasserstoffgasatmosphäre zu **3** umgesetzt. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel abgezogen. Ausbeute: 3,06 g (95 %); ESI-MS: $m/z = 345,6$ [M+H]⁺; M_r = 344,4 (berechnet) für C₂₂H₂₀N₂O₂.

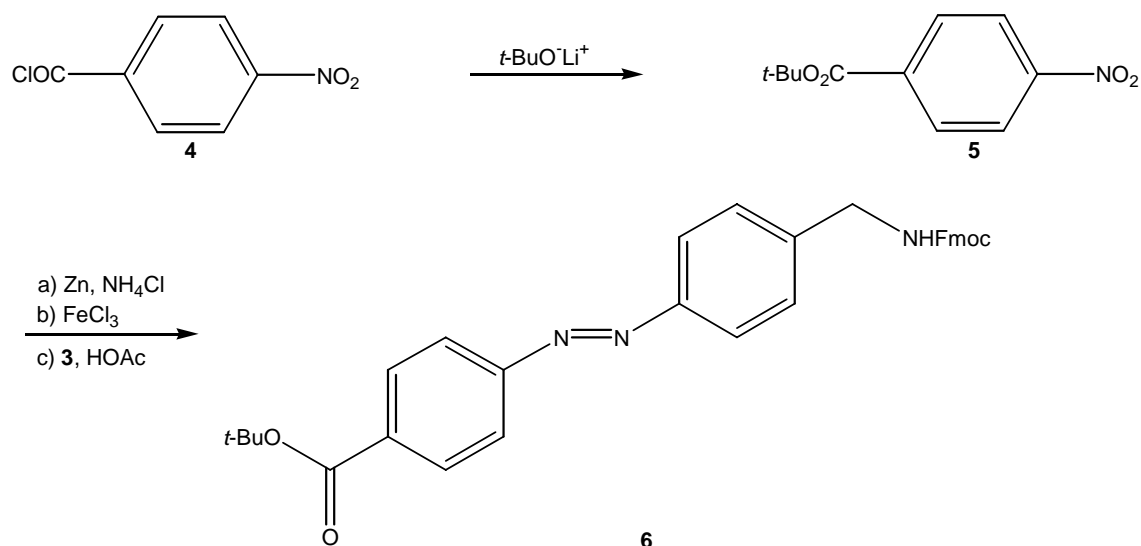


Abbildung 2.4: Schritt 2: Die Synthese der Carboxy-Seite und Zusammenfügung des Azoschalters

Zu einer Lösung von 4-Nitrobenzoylchlorid (**4**) (5,96 g; 32,1 mmol) in 60 ml THF wird Lithium-*tert*-butoxid (50 ml; 50 mmol, 1M-Lösung in THF) gegeben und für 1 h bei 0 °C gerührt dann noch 12 h bei 30 °C. Nach Absaugen des Produkts und Aufnehmen in Ethylacetat wurde 3 x mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung, 3 x mit 5%iger KHSO_4 -Lösung, einmal mit gesättigter NaCl -Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt (**5**) mit Hexan aus CH_2Cl_2 gefällt. Ausbeute: 3,82 g (53 %); ESI-MS: $m/z = 224,4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M_r = 223,08$ (berechnet) für $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4$.

Zu einer Lösung von **5** (1,38 g; 6,2 mmol) in 2-Methoxyethanol (30 ml) wurden Zink (1,20 g; 18,6 mmol; 3eq) und NH_4Cl (0,86 g; 10 mmol) gegeben und bei Raumtemperatur 3 h gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel abgezogen und in CH_2Cl_2 resuspendiert. Nach dem Abfiltrieren der Zn/ZnO -Feststoffe wurde das entstandene *t*-Butyl-4-(hydroxylamin)benzoat mit Hexan ausgefällt. Sofort danach wurde in einem Ethanol / Wasser-Gemisch (1:5) bei 0 °C durch Zugabe von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,19 g; 15,5 mmol; 2,5 eq) das *tert*-Butyl-4-nitrosobenzoat generiert. Nach Extrahieren mit TBME, Waschen mit Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel abgezogen. Der zurückgebliebene grünliche Feststoff wurde direkt mit **3** in Essigsäure umgesetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Ausbeute: 1,16 g (35 %); ESI-MS: $m/z = 534,69$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M_r = 533,23$ (berechnet) für $\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$.

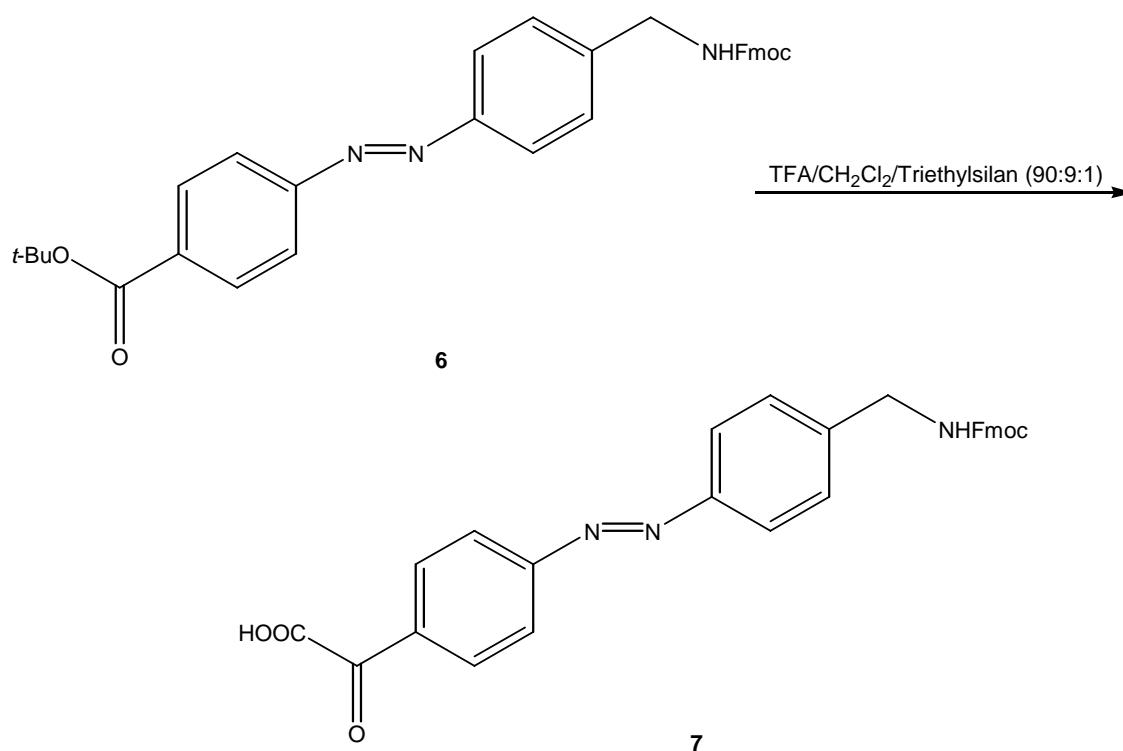


Abbildung 2.5: Schritt 3: Entschützung der Carboxygruppe

In einer Lösung aus 10 ml TFA/CH₂Cl₂/Triethylsilan (90:9:1; v/v) wurde **6** (1,16 g; 2,18 mmol) über 1 h gerührt, um anschließend nach Entfernen der Lösung mit Ethanol aus CH₂Cl₂ gefällt zu werden. [49] Aubeute: 0,43 g (42 %); ESI-MS: $m/z = 478,30$ [M+H]⁺; M_r = 477,17 (berechnet) für C₂₉H₂₃N₃O₄.

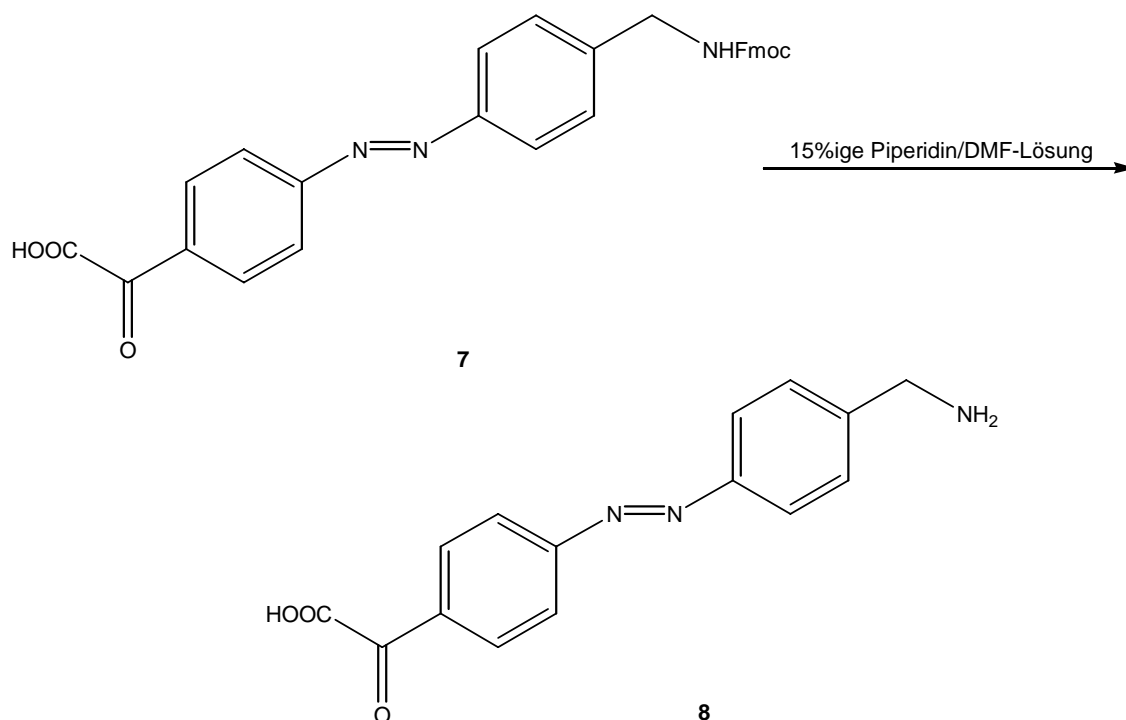


Abbildung 2.6: Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe von AMPB (7).

7 (0,15 g; 0,32 mmol) wurde in 15%iger Piperidin/DMF-Lösung (1 ml) für 10 min gerührt, das Lösungsmittel weitestgehend entfernt und aus Methanol und Diethylether gefällt, abgesaugt und gewaschen. Ausbeute: 31,2 mg (38 %) ESI-MS: $m/z = 256,2$ $[M+H]^+$; $M_r = 255,1$ (berechnet) für $C_{14}H_{13}N_3O_2$.

2.2.2.2. Methode nach Priewisch *et al.*

Aufgrund der geringen Ausbeute auch wegen der notwendigen Isolierung der instabilen Hydroxylamin-Komponente, wurde später versucht über die Methode nach Priewisch *et al.* [63], die im Folgenden beschrieben ist, größere Ausbeuten zu erzielen. Die Synthese der Aminoseite (3) des Schalters jedoch wurde weiterhin nach der Methode von Ulysse *et al.* durchgeführt.

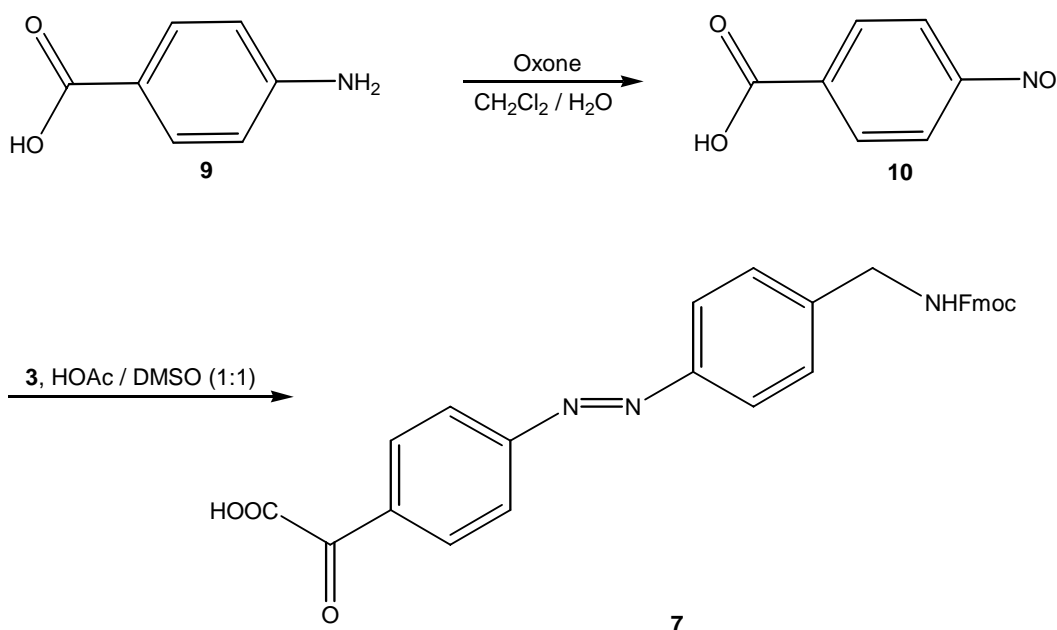


Abbildung 2.7: Synthese des Fmoc-geschützten AMPB (**7**) nach Priewisch *et al.*

4-Aminobenzoesäure (**9**, 3,6 g; 26,27 mmol) wurde in 40 ml CH_2Cl_2 gelöst und dann Oxone (stabiles Dreifachsalz aus $2\text{KHSO}_5\cdot\text{KHSO}_4\cdot\text{K}_2\text{SO}_4$; 32,4 g; 52,68 mmol) in 162 ml Wasser gelöst hinzu gegeben. Nach 1 h Rühren unter Stickstoffatmosphäre wurde das Produkt (**10**) abgesaugt mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Ausbeute (Rohprodukt): 3,6 g (90,7 %).

Direkt anschließend wurde **10** (3,6 g; 23,83 mmol) in 325 ml AcOH / DMSO (1:1) gelöst (Ultraschallbad) und mit **3** (8,21 g; 23,83 mmol) zur Reaktion gebracht. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Produkt (**7**) mit Wasser gefällt, abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Umkristallisation erfolgte aus Aceton / Wasser. Ausbeute: 7,30 g (64,2 %); ESI-MS: $m/z = 478,30$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $M_r = 477,17$ (berechnet) für $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **7** in $\text{DMSO}-d_6$ bei einem Feld von 250 MHz konnte folgendermaßen analysiert werden:

δ : 13.3 (bs, 1H), 8.19 (d, $^3J = 8.53$, 2H,), 8.07 – 7.84 (m, 6H), 7.75 (d, $^3J = 7.21$, 2H), 7.62 – 7.18 (m, 7H), 4.50 – 4.19 (m, 5H);

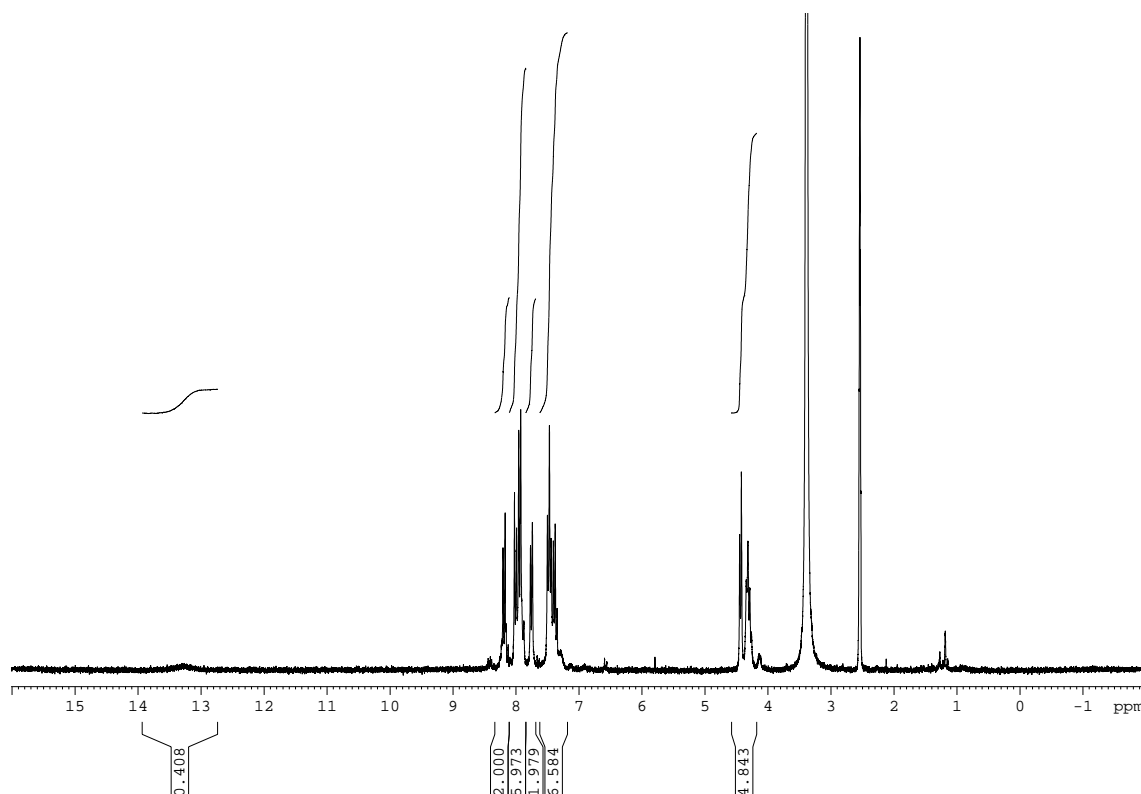


Abbildung 2.8: ^1H -NMR-Spektrum von 7 in DMSO-d_6 bei einem Feld von 250 MHz

2.2.3. Festphasensynthese

Die Peptidsynthese erfolgte automatisiert auf einem Peptidsynthesizer Applied Biosystems 433A z. T. nach Standardmethoden der Fmoc-Festphasenpeptidsynthese und HBTU/HOBt-Aktivierung und wurde später modifiziert, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Das verwendete Harz (H-Leu-2-ClTrt-Harz) hat eine Beladung von 0,74 mmol/g. Die Synthese wurde in 4 Schritte unterteilt; alle wurden im Maßstab von 0,1 mmol durchgeführt.

Synthese für das Azopeptid Ac-Cys-Gly-Gly-Gly-Glu-Leu-Trp-Lys-Leu-His-Glu-Glu-Leu-Leu-Lys-Lys-Phe-Glu-Glu-Leu-AMPB-Leu-His-Glu-Glu-Arg-Leu-Lys-Lys-Leu-OH:

Zuerst wurde der Teil vor dem Azoschalter (9 Aminosäuren) nach Standardmethoden hergestellt: zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der ersten an das Harz zu kuppelnden Aminosäure wurde eine Piperidin / DMF-Lösung (22 %) benutzt, die Kupplung der einzelnen Aminosäuren

(1 mmol / Steckmodul) fand mit 0.45 M HBTU / HOBt und 2M DIEA in DMF (27 – 39 min / Aminosäure) innerhalb von 45 min statt. Entschützt wurde das Peptid durch Schütteln über 30 min in einer Lösung aus TFA (95 %) sowie TIS, H₂O, EDT und Phenol (je 1,25 %). Nach Filtrieren über Glaswolle wurde das Peptid bei -20 °C aus TBME (4 °C) in 20 min gefällt und dreimal mit TBME gewaschen. MALDI: $m/z = 1166,29$ $[M + H^+]$; $M_r = 1165,39$ (berechnet) für C₅₂H₉₂N₁₆O₁₄.

Anschließend wurde in einem einzelnen Schritt 7 wie alle anderen Aminosäuren in einem Steckmodul angefügt. Im Unterschied zu den Aminosäuren zuvor wurde hier eine Kupplungszeitspanne von 90 min eingestellt. MALDI: $m/z = 1404,62$ $[M + H^+]$; $M_r = 1403,63$ (berechnet) für C₆₆H₁₀₂N₁₈O₁₆.

Selbiges Verfahren wurde mit dem nachfolgenden Leucin gemacht. MALDI: $m/z = 1518,33$ $[M + H^+]$; $M_r = 1516,78$ (berechnet) für C₇₂H₁₁₃N₁₉O₁₇.

Für den letzten Teil wurde erneut die Synthese verändert: statt der Kupplungsreagenzien HBTU / HOBt wurde nun HATU verwendet, was eine höhere Reaktivität und somit eine bessere Kupplungseffizienz liefern sollte. Weiterhin wurden hier jeweils zwei Steckmodule für jede Aminosäure benutzt (double coupling) und diese mit jeweils 5 mmol der entsprechenden Aminosäure befüllt. Insgesamt wurde also auch die zehnfache Menge Aminosäure zur Kupplung bereitgestellt, die dann über 90 min pro Steckmodul verlief. Außerdem wurden Acetylierungsschritte bei diesem Teil der Peptidsynthese vorgenommen, um nicht gekuppelte Enden der Peptidkette vor Ankuppeln der nächsten Aminosäure unreaktiv zu machen. Bei insgesamt 19 zu kuppelnden Aminosäuren in diesem Teil wurde dieser Schritt nach der 4., 7., 10., 12., 15. 18. und der letzten (19.) Aminosäure durchgeführt. Die Abspaltung des kompletten Peptids vom Harz wurde mit TFA / CH₂Cl₂ / Triethylsilan (95 : 3,5 : 1,5) in 10 min bei Raumtemperatur vorgenommen. Auf eine Verkleinerung des Volumens folgte die Ausfällung des Peptids durch Diethylether (4 °C) und Lagerung bei -20 °C für 20 min. Das Präzipitat wurde dreimal mit Diethylether gewaschen. Ausbeute: 6.8 %; homogen in HPLC: $t_R = 19.34$ min; MALDI: $m/z = 3785.66$ $[M + H^+]$; $M_r = 3785.24$ (berechnet) für C₁₇₆H₂₆₉N₄₅O₄₆S.

Später wurde diese Synthese dahingehend modifiziert, dass anstatt Cystein mit freier SH-Gruppe Cystein mit einer Schutzgruppe an dieser Stelle (-*tert*-Buthio) eingeführt wurde. Auf die Vorgehensweise innerhalb der Festphasensynthese hatte dies aber keinen weiteren Einfluß. MALDI: $m/z = 3873.70$ $[M + H^+]$; $M_r = 3873.28$ (berechnet) für C₁₈₀H₂₇₆N₄₅O₄₆S₂. Die nachfolgend vorgestellten

Ergebnisse (Kap. 2.3) wurden allerdings alle mit dem am Cystein ungeschützten Azozeptid durchgeführt. Für die Daten, die im Ausblick gezeigt werden (Kap. 2.4) wurde aus Stabilitätsgründen jedoch das Peptid, das die geschützte Sulfidgruppe enthält, benutzt.

2.2.4. UV/Vis-Messungen

In den cw-Experimenten wurden beide Isomerisierungsrichtungen (*trans* -> *cis* und *cis* -> *trans*) analysiert. Da die *trans*-Isomere die thermodynamisch stabileren Formen sind, mussten die *cis*-Isomere durch Belichtung der Probe mit einer cw-HgXe-Lampe (Hamamatsu LC4), die mit einer optischen Faser (Durchmesser 5 mm) ausgestattet war, bei 367 nm hergestellt werden. Die Ausgangsleistung der Lampe nach der Faser und zwei Filtern (1 mm UG 1, 2 mm WG 320) betrug ~200 mW. Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden auf einem Analytik Jena Spektrometer (Specord S 100) aufgenommen. Die Proben wurden in einer 1 mm Siliciumdioxid-Küvette aufgenommen. Um die Effektivität der Photoschaltung zu untersuchen, wurde die Probe mit dem spektral gefilterten Licht der cw-HgXe-Lampe für 2 s belichtet und danach ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis im Spektrum keine lichtinduzierten Änderungen mehr identifiziert werden konnten. Die thermisch aktivierte Rückreaktion wurde überwacht, indem in totaler Dunkelheit alle 300 s mit dem gleichen Spektrometer ein Spektrum aufgenommen wurde.

2.2.5. Ultrakurzzeitmessungen

Die transienten Absorptionsmessungen wurden mit einem Femtosekunden Anreg- / Abtast-Aufbau (Pump-Probe-Spektroskopie) durchgeführt. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 2.9 zu sehen.

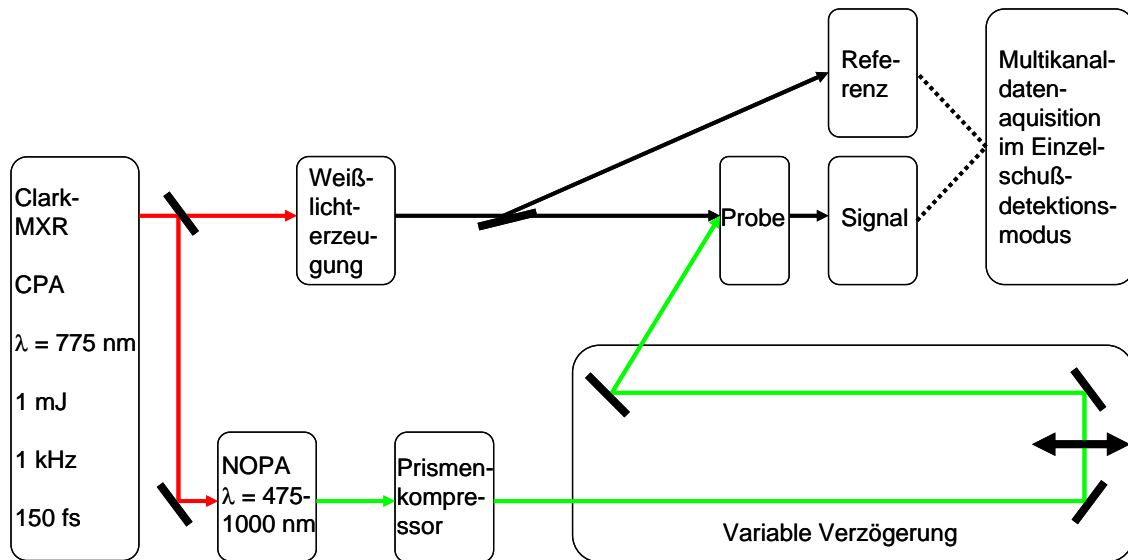


Abbildung 2.9: Prinzip eines Femtosekundenspektrometers, wie es in der Arbeitsgruppe Wachtveitl (in Frankfurt am Main) benutzt wird.

Das Prinzip eines solchen Systems besteht darin, dass ein Laserpuls sowohl als Anreg- als auch als Abtast-Impuls verwendet wird. Dadurch wird die Messung durch nur einen Puls getriggert und schafft so eine hohe Genauigkeit in der Messung. Um das mit einem Laserpuls zu bewerkstelligen, muss dieser erst geteilt werden (in Abbildung 2.9 rot): ein Teil (der intensive) wird zum Anregen der Probe benutzt (grün), während der andere (schwächere) zur Weißlichterzeugung benutzt wird (schwarz), um dann die Veränderungen in der Probe zu messen.

Das Lasersystem selbst ist ein Titan-Saphir-Laser des Modells Clark-MXR CPA 2001. Um Laserpulse im Femtosekundenbereich mit viel Energie zu erzeugen wird das Prinzip der „chirped pulse amplification“ (CPA) benutzt. [64; 65] Hierbei wird der Puls zunächst gestreckt, dann verstärkt (Faktor $10^5 - 10^6$) und anschließend wieder komprimiert.

Um nun den Impuls zur Anregung zu generieren, werden nichtlineare optische Prozesse verwendet: im NOPA (non-collinear optical parametric amplifier) ist dies der Fall. Hier wird ein nichtlinearer Kristall (z.B. β -Bariumborat, BBO) verwendet, mit dem man ultrakurze Pulse bei verschiedenen Wellenlängen generieren kann. Um diesen Kristall nutzen zu können, muss zuvor Weißlicht, also spektral breites Licht, generiert werden, da dieses im NOPA als Seedquelle benutzt wird.

Weißlicht wird an anderer Stelle im Aufbau ebenfalls benutzt, nämlich um die Probe abzutasten. Da man hierfür ja einen spektral möglichst breiten Bereich nutzen will, eignet sich Weißlicht hierfür sehr gut. Um dieses zu erzeugen, wird entweder Kalziumfluorid (CaF_2) oder Saphir benutzt, wodurch die benötigten spektral breiten Pulse erzeugt werden. Der Mechanismus, der hier zugrunde liegt, ist noch nicht vollkommen geklärt, es spielen aber nichtlineare Effekte die entscheidende Rolle dabei, wie etwa Selbstfokussierung oder Selbstphasenmodulation. [66] Für die hier dargestellten Experimente wurde sowohl für die Weißlichterzeugung im NOPA als auch für die Abtastimpulse Saphir verwendet. Im NOPA wurden die Pulse bei 475 nm zentriert, und auf einen Durchmesser von ca. 100 μm in der Probe fokussiert. Die Pulsenergien lagen etwa bei 200 nJ, was niedrig genug ist, um Multi-Photonen-Anregungen in der Probe zu verhindern. Für das Abtast-Weißlicht wurde ein 2 mm dickes Saphirplättchen benutzt, dessen Polarisation parallel zum Anregungspuls ausgerichtet war, die spektrale Weite wurde auf 390 – 680 nm eingestellt, womit die photoinduzierten Absorptionsänderungen in der Probe dann gemessen wurden. Wegen des Versatzes der Gruppengeschwindigkeiten zwischen Anreg- und Abtast-Licht ist die zeitliche Auflösung des Systems wellenlängenabhängig, die Kreuzkorrelationsbreite für den gesamten untersuchten spektralen Bereich ist hier zwischen 100 und 120 fs. Die Pulse wurden dann aufgeteilt auf zwei Spektrometer, ein Teil geht durch die Probe, der andere Teil dient als Referenz, sie wurden jeweils von einem 42-kanaligen Photodiodenzeilenarray aufgenommen. Hieraus ergibt sich eine spektrale Auflösung von 8 nm. Die Datenaufnahme wurde im Einzelschussbetrieb vorgenommen und durch extra in die Strahlenwege eingebaute „Chopper“ referenziert, was am Ende ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 10^4 lieferte. [67] Bei den Messungen wurde jeweils über 1000 Laserimpulse pro Messpunkt gemittelt.

Weiterhin musste gewährleistet sein, dass bereits angeregtes Probenvolumen vor dem nächsten Impuls rechtzeitig ausgetauscht wird. Dies wurde in den hier vorgestellten Messungen durch einen winzigen Rührfisch in der Küvette (optische Weglänge: 1 mm) gewährleistet. Somit wurden mehrfache Anregungen von einzelnen Molekülen wie auch Akkumulationen von Photoprodukten im Messbereich der Küvette verhindert. Es wurde auch versucht, das Probenvolumen mit einer Spritzenpumpe durch den entsprechenden Anreg- und Messbereich zu pumpen, um ganz sicher zu gehen, nicht zweimal dieselben Moleküle anzuregen, was jedoch an der zu geringen

Menge bzw. Konzentration der Probe scheiterte. Daher wurden zur Kontrolle vor und nach den transienten Absorptionsmessungen cw-Spektren aufgenommen, in denen jedoch kein Hinweis auf eine signifikante Anreicherung des *cis*-Isomers in den fs-Experimenten zu erkennen war.

Bevor die aufgenommenen Daten nun analysiert werden konnten, war es nötig, diverse Korrekturen vorzunehmen, und zwar bezüglich der Gruppengeschwindigkeitenverteilung („group velocity dispersion“, GVD) und der zeitlichen Nullpunkte. Mit dem von Kovalenko *et al.* [68] beschriebenen Verfahren, das die temporäre Evolution des kohärenten Signals und mindestens quadratische Fit-Algorithmen benutzt, konnte bei allen Wellenlängen der zeitliche Nullpunkt festgestellt werden. Die Daten wurden dann mit einem globalen Anpassungsalgorithmus (Marquardt downhill algorithm) quantitativ analysiert, unter Berücksichtigung der Apparatefunktion. Dies erlaubt eine simultane Optimierung von n exponentiellen Zerfällen, während die Amplituden jeder kinetischen Komponente wellenlängenabhängige Fit-Parameter sind. [69]

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Synthese von AMPB und Azozeptid

Die Synthese von AMPB (7), das als Pseudoamino-säure in der Festphasensynthese des Azozeptids eingesetzt wurde, gelang nach zwei verschiedenen Syntheserouten, so dass besonders durch die Synthese nach Priewisch *et al.* genug Material in hoher Qualität für Festphasensynthese bereitgestellt werden konnte. Auch die beidseitig entschützte Version des Azoschalters (8) konnte in ausreichender Menge produziert werden.

Die Motivation für diese Arbeit war, auf den bereits erbrachten Leistungen auf dem Feld der molekularen Schalter in dem Sinne aufzubauen, dass das zu untersuchende System mehrere lichtkontrollierte Funktionen besitzt und damit auch zwangsläufig größer als die bisherigen Systeme ist.

Robertson *et al.* [70] entwarfen aus dem Cytochrom bc_1 Komplex ein Peptid, welches sie sehr erfolgreich für den Aufbau einer Di-Häm-Maquette benutzen konnten. Als Maquettes werden hier funktionale, synthetische Proteine oder Peptide bezeichnet, die vereinfachte Formen ihrer biologischen Gegenstücke

darstellen. [71] Von Interesse war in ihrem Fall, Häm-Gruppen in einer künstlichen Umgebung so einzubauen, dass sie in ihren spektralen und elektrochemischen Eigenschaften natürlichen Häm-Gruppen sehr ähnlich sind.

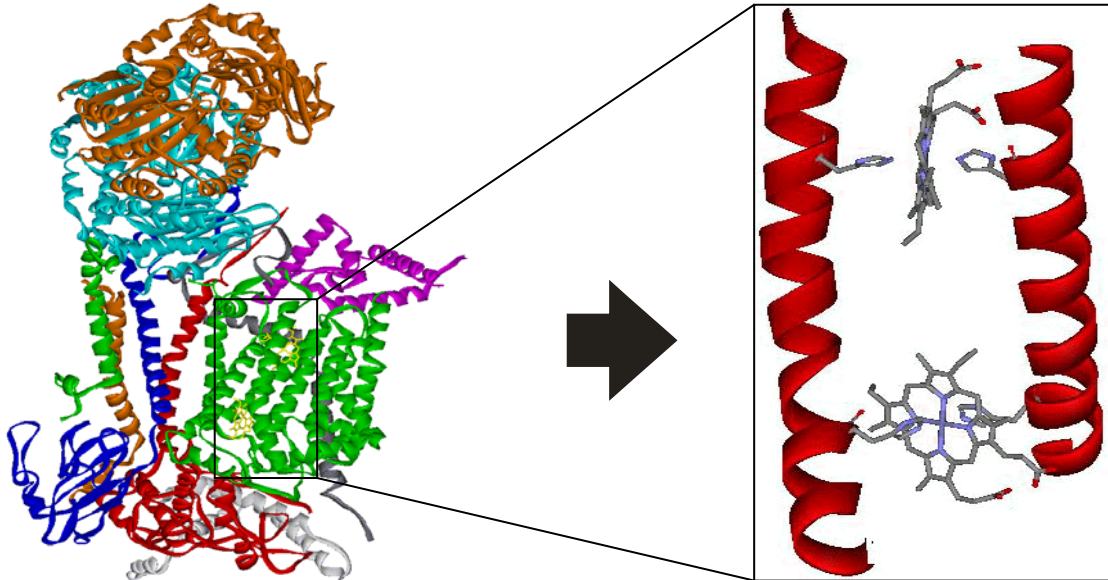


Abbildung 2.10: Cytochrom bc₁-Komplex (pdb-Code: 1LOL) mit der Untereinheit, die die beiden Helices B und D sowie zwei Häms beinhaltet. Jedes der beiden Häms ist mit zwei Histidinen verbunden.

Dies konnte erreicht werden, in dem man die Hauptmerkmale der Helices im Cytochrom bc₁, die die Häms binden, für die Aminosäuresequenz eines synthetischen Peptids benutzt hat, u. a. dass der Abstand zwischen den beiden Histidinen 14 Aminosäuren beträgt. Da im Cytochrom bc₁ diese Regionen in sehr unpolaren Bereichen liegen, sind hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren in diesen Helices zu finden. Da das synthetische Peptid jedoch wasserlöslich sein sollte, wurden möglichst viele hydrophile Aminosäuren eingebaut. Das Peptid besteht schließlich aus 27 Aminosäuren an dessen N-Terminus noch vier Aminosäuren (GGGC) angehängt wurden, um mit Hilfe einer Disulfidbrücke zwei solcher Peptide zu einem Dimer verbinden zu können.

Cytochrom bc₁ Helix D:	-RFFSLHYLLPFVIAALVAIHIWAF-
	195 205 215
Cytochrom bc₁ Helix B:	-AMRYIHANGASLFFLAVYIHIFRG-
	95 105 115
Synthetisches Peptid:	-CGGGELWKLHEELLKKFEELLKLHEERLKL-
	1 10 20 30

Abbildung 2.11: Sequenzen der Helices aus Cytochrom bc₁ und das von Robertson *et al.* [70] entworfene Peptid.

Für diese Arbeit wurde dieses System aufgegriffen, da es möglich ist, die Eisen-Histidin-Bindung, die das Häm mit dem Peptid eingeht, mit einem Laser (der den Azoschalter schaltet) in einen reaktiven, ungebundenen Zustand zu versetzen. In diesem System kann man also mit Laserpulsen eine Reaktion starten, deren Konsequenzen man mit Hilfe von mehreren Spektroskopiearten (UV/Vis, Ultrakurzzeit, IR, NMR) untersuchen kann.

Hierfür war es nun notwendig, den Azoschalter in das Peptid einzuführen. Um einen möglichst großen Effekt bei Experimenten zu erzielen wurde der Schalter, dessen Länge ungefähr zwei Aminosäureresten entspricht, anstelle der beiden Aminosäuren L21 und K22 in das Rückgrat dieses Peptids eingefügt, also an einer Position zwischen den beiden Histidinen. In einer vollständigen Maquette würde durch die Position des Azoschalters zwischen den beiden Histidinen des Peptids durch Schalten des Azoschalters ein Teil des Peptids, das ein an ein Häm bindendes Histidin enthält, ausgeklappt werden. Ein Modell des daraus resultierenden Azopeptids (das Monomer) in ist Abbildung 2.12 zu sehen. Dieses Peptid war das erste Ziel dieses Projekts, alle im Ergebnisteil der Arbeit (Kap 2.3.) vorgestellten Messungen fanden mit diesem Peptid statt.

Ac-CGGGELWKLHEELLKKFEEL-AMPB-LHEERLKKL

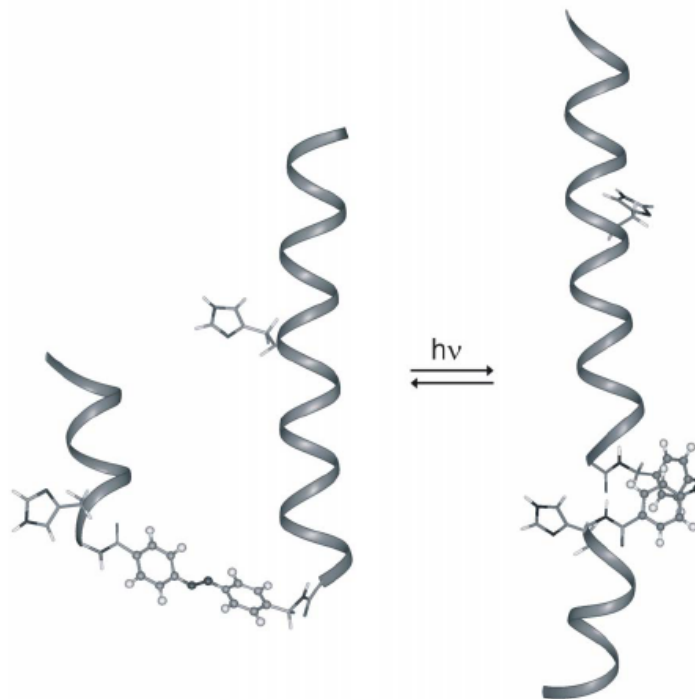


Abbildung 2.12: Molekulares Model des synthetisierten *trans*- (links) und *cis*-Azopeptids (rechts) dargestellt mit InisghtII (Accelrys). Gezeigt sind das Peptidrückgrat und die AMPB-Gruppe, ebenso die Histidin-Seitenketten. *Trans/cis*- ebenso wie *cis/trans*-Isomerisation kann bei bestimmten Wellenlängen photoinduziert werden. Die Aminosäuresequenz des Azopeptids ist oben angegeben. [72]

Um das oben beschriebene Azopeptid herzustellen, wurde grundsätzlich von der sogenannten „Fmoc-Strategie“ (im Gegensatz zur „Boc-Strategie“) ausgegangen. Für die Synthese sollte das AMPB wie eine ganz normale Aminosäure am Synthesizer in das Peptid eingebaut werden. Es wurde also wie die anderen Aminosäuren auch als Fmoc-geschützte Version (7) in ein Steckmodul gegeben. Bevor damit begonnen wurde das Azopeptid zu synthetisieren, wurde zunächst das Peptid ohne Azoschalter synthetisiert um sicher zu gehen, dass dies problemlos bei Standardbedingungen (45 min Kupplungszeit, HBTU/HOBt, 1 Steckmodul) gelingt. Da dies der Fall war, konnte nun das Azopeptid synthetisiert werden.

2.3.2. UV/Vis-Messungen an AMPB und Azozeptid

Die Absorptionsspektren von *trans*-AMPB (7, in DMSO) zeigen die typischen spektroskopischen Eigenschaften, die bereits für andere Azozeptide beschrieben wurden. [51] Die $\pi\pi^*$ -Bande ist um 335 nm lokalisiert. Eine exakte Auflösung ist nicht möglich, da Anteile der Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls in dieser Region absorbieren. Die $n\pi^*$ -Bande des *trans*-AMPB ist deutlich identifizierbar und liegt bei 448 nm.

Verglichen mit AMPB (7) sind die wichtigsten spektralen Eigenschaften des *trans*-Azozeptids in Wasser sehr ähnlich (Abbildung 2.13). Die $\pi\pi^*$ -Bande liegt bei 330 nm während das Maximum der $n\pi^*$ -Bande bei 428 nm zu sehen ist. Beide Banden können zweifelsfrei identifiziert werden, wobei allerdings gesagt werden muss, dass das Azozeptid eine größere Streuung aufweist als das Azozeptid allein. Bei 220 nm kann eine starke Bande den Rückgratabsorptionen des Peptids zugewiesen werden, während bei 280 nm die aromatische Seitenkette des Tryptophans als Schulter in der $\pi\pi^*$ -Bande des AMPB zu erkennen ist. Diese Banden sind offensichtlich nicht in den Photoisomerisationsprozeß eingebunden, da sie sich über die gesamte Belichtungsdauer nicht ändern.

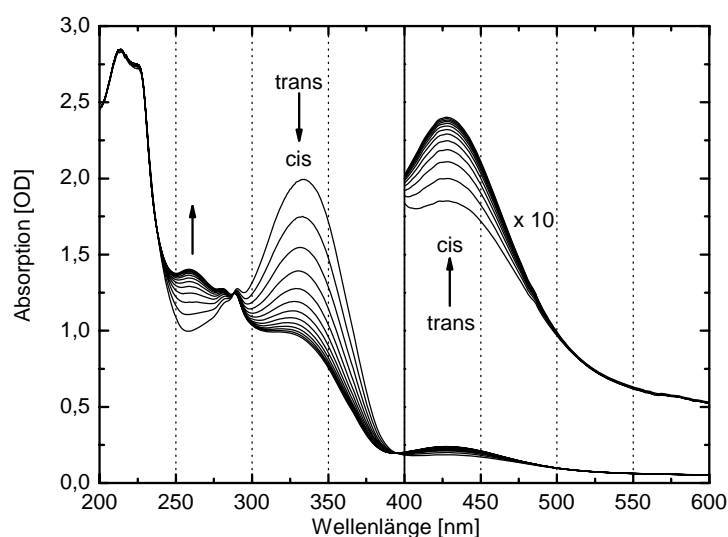


Abbildung 2.13: Absorptionsspektren des Azozeptids bei kontinuierlicher Belichtung bei 367 nm (*trans* -> *cis*). Deutlich zu erkennen ist der Abfall der *trans*- $\pi\pi^*$ -Bande (~330 nm) ebenso wie die Zunahme der *cis*- $\pi\pi^*$ -Bande (~260 nm) und der *cis*- $n\pi^*$ -Bande (~428 nm). [72]

Die *trans* \rightarrow *cis* Isomerisation kann sowohl in AMPB als auch im Azopeptid entweder durch Anregung der $n\pi^*$ - oder der $\pi\pi^*$ -Bande erreicht werden. Durch Belichtung des *trans*-Isomers wird die Bande bei 330 nm schwächer und eine Bande bei 260 nm erscheint (Abbildung 2.14). Dieser Anstieg ist der $\pi\pi^*$ -Bande deren sowohl spektrale Position als auch ihr Extinktions-Koeffizient in der *cis*-Form stark verändert wird, geschuldet. [51] Weiterhin kann ein isosbestischer Punkt bei 288 nm identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ändert die $n\pi^*$ -Bande ihre Position praktisch nicht, und das Maximum der Bande bleibt bei 428 nm. Trotzdem erhöht sich der Extinktionskoeffizient bei der *trans* \rightarrow *cis* Isomerisation, was mit anderen untersuchten AMPB-Peptiden übereinstimmt. [73] Die *cis* \rightarrow *trans* Isomerisation hingegen kann auch thermisch induziert über eine Zeitspanne von mehreren Stunden bei Raumtemperatur stattfinden.

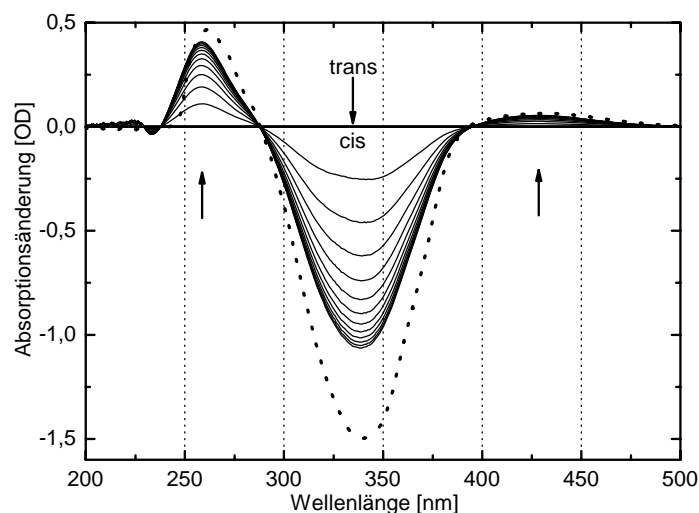


Abbildung 2.14: Absorptionsänderungen des Azopeptids bei Belichtung mit einer cw-HgXe-Lampe (2s, *trans* \rightarrow *cis*). Der Aufbau der verschiedenen Banden ist deutlich zu erkennen. Die gestrichelte Linie zeigt die Absorptionsunterschiede von AMPB zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Isomer. [72]

Für die thermische Rückreaktion (Abbildung 2.15) ist eine biexponentielle Fit-Funktion nötig, um das Wiedererscheinen der $\pi\pi^*$ -Bande des *trans*-Isomers bei 330 nm zu beschreiben ($\tau_1 = 0.18 \pm 0.005$ h, $\tau_2 = 2.96 \pm 0.02$ h). Der Abfall der *cis*-Bandenabsorption bei 260 nm kann weder mit einer mono- noch einer biexponentiellen Funktion gefittet werden, allerdings konnte zusätzlich zu einer

schnellen Zeitkonstante mit $\tau_1 = 0,18$ h ein unspezifischer Abfall der Bande beobachtet werden, der sich über einen Zeitraum, der um einige Größenordnungen länger ist, verteilt. Wenn man beide Funktionen vergleicht, ist es offensichtlich, dass das zeitliche Verhalten der *trans*- und *cis*-Anteile nicht gleich sind. Ein Grund hierfür könnte die mangelnde Stabilität des Azopeptids nach Belichtung sein, was mit den Beobachtungen der abnehmenden Absorption entweder des *cis*-AMPB oder der aromatischen Anteile der Peptidseitenketten übereinstimmt. Verstärkt wird diese Annahme dadurch, dass diese Messungen mit der Form des Azopeptids gemacht wurden, die keine Schutzgruppe am Schwefel des Cysteins trägt. Daher kann man mutmaßen, dass hier die Zersetzung des Azopeptids, initiiert durch die freie SH-Gruppe die die Azogruppe angreifen kann, stattfindet.

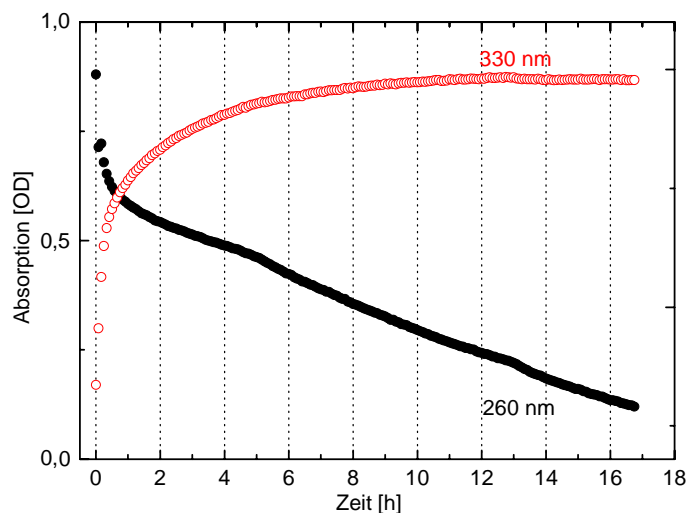


Abbildung 2.15: Absorption bei ausgewählten Wellenlängen als Funktion der Zeit um die thermisch induzierte Rückreaktion (*cis* → *trans*) nach UV-Anregung zu zeigen. Die Daten für die Transienten bei 330 und 260 nm können durch biexponentielle Zunahme bzw. multiexponentiellen Abfall gefittet werden. [72]

2.3.3. Ultrakurzzeitmessungen an AMPB und dem Azopeptid

Zeitabhängige Absorptionsänderungen der *trans* → *cis* Isomerisation von sowohl AMPB (7) als auch des Azopeptids wurden bei mehr als 30 verschiedenen Wellenlängen zwischen 390 und 680 nm durchgeführt. Die 3D Darstellung der beiden Experimente ist in folgender Abbildung zu sehen:

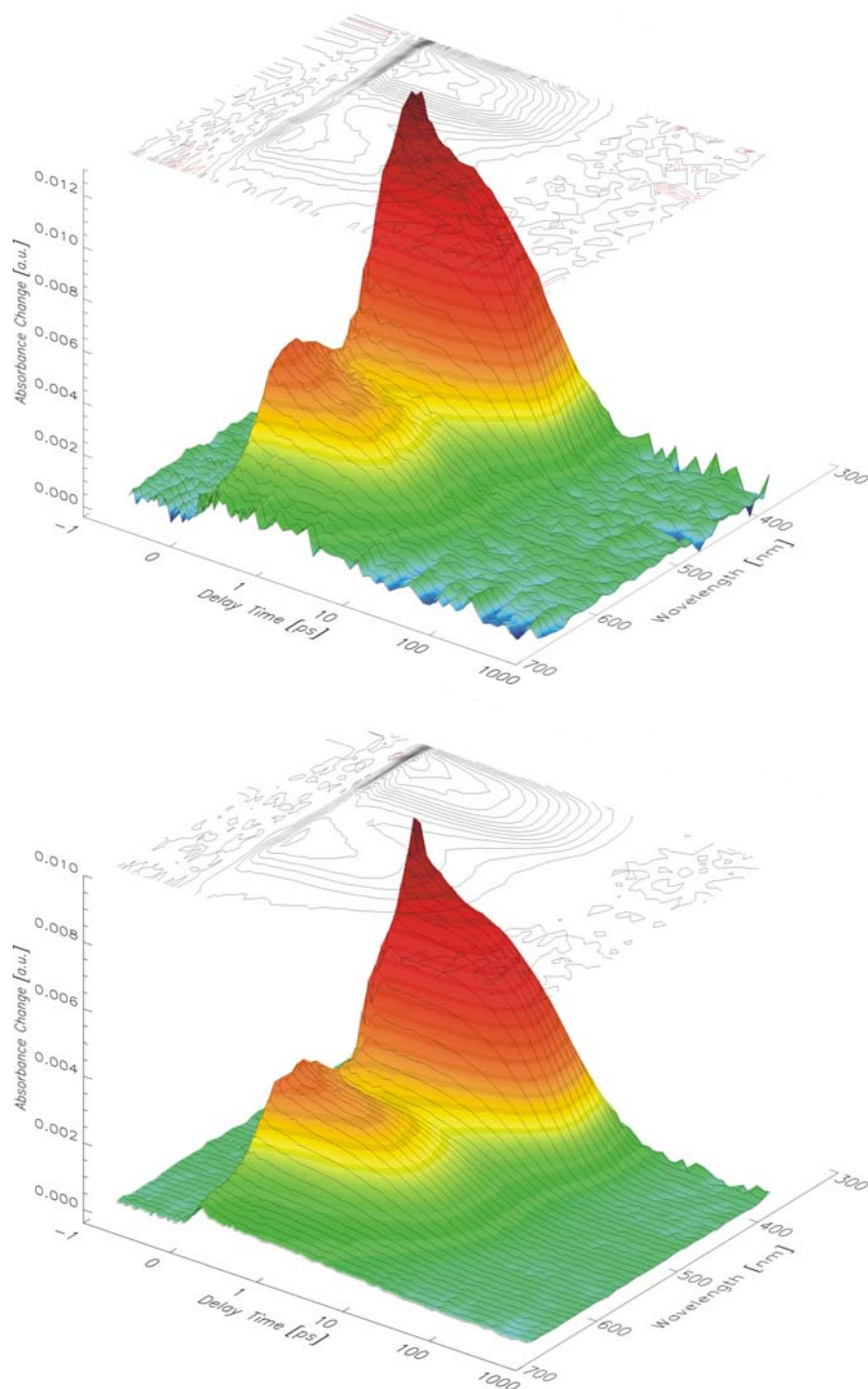


Abbildung 2.16: Transiente Absorptionsänderungen von *trans*-AMPB (7, oben) und dem *trans*-Azozeptid (unten) nach Photoanregung bei 475 nm (*trans* → *cis*). Rot entspricht positiver Absorptionsänderung, blau negativer.

Für einen Überblick über die zeitliche Entwicklung des *trans*-Azozeptids (die qualitativ sehr ähnlich der von AMPB (7) ist), das bei 475 nm angeregt wurde, ist eine Darstellung wie in Abbildung 2.17 sinnvoll: eine sofortige positive

Absorptionsänderung für fast den gesamten untersuchten spektralen Bereich nach der Photoanregung. Eine breite Absorption des angeregten Zustandes, die aus zwei Banden besteht, kann identifiziert werden. Sie haben ihr Zentrum um 540 bzw. 400 nm. Der Abfall des angeregten Zustandes folgt multiexponentiellen Kinetiken auf Zeitskalen zwischen einigen hundert fs bis zu wenigen ps. In Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen an AMPB werden nur sehr schwache langlebige Absorptionsänderungen in dieser spektralen Region erwartet [51; 74], die bei den Messungen hier aufgrund des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht unzweifelhaft aufzulösen sind.

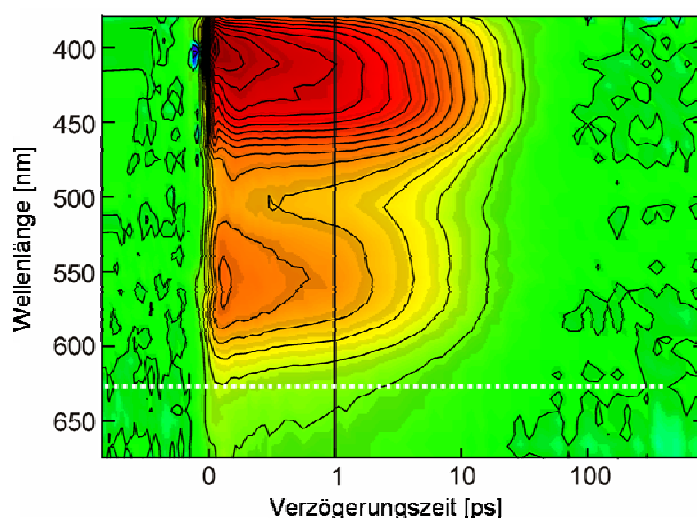


Abbildung 2.17: Zeitliche Evolution der transienten Absorptionsdifferenz des *trans*-Azopeptids nach Anregung (*trans* \rightarrow *cis*) mit einem 475 nm Puls (Multikanal-Detektion). Die Signalamplituden sind farbkodiert: rot indiziert positive, grün keine und blau negative Absorptionsänderungen. Die Skalierung ist linear für $\tau < 1$ ps und logarithmisch für längere Verzögerungszeiten. Die gepunktete Linie repräsentiert die spektrale Position der für Abbildung 2.19 ausgewählten Transienten. [72]

Mehr quantitative Schlüsse aus diesen Ergebnissen werden erhalten, wenn man einen direkten Vergleich von einzelnen Transienten von AMPB (7) und dem Azopeptid anstellt. Um dies tun zu können, musste sichergestellt sein, dass die Dynamik von AMPB (7) in DMSO mit der des Azopeptids in Wasser vergleichbar ist. Um diese Annahme machen zu können, wurde AMPB (7) mit dem an C- und N-Terminus entschützten AMPB (8) verglichen: die transienten Absorptionsänderungen, die in beiden Lösungsmitteln beobachtet werden konnten, waren in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen die von Satzger *et al.* [75] publiziert wurden. In der schnellen Reaktion des AMPB-

Chromophors gelöst in Wasser und DMSO konnten ähnliche Zeitkonstanten beobachtet werden und nur die langsamen Reaktionen, die den konformationellen Änderungen des Peptid-Teils zugeschrieben werden, unterschieden sich um einen Faktor 2. Es muss allerdings erwähnt werden, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für das beidseitig entschützte AMPB (8) viel schlechter war.

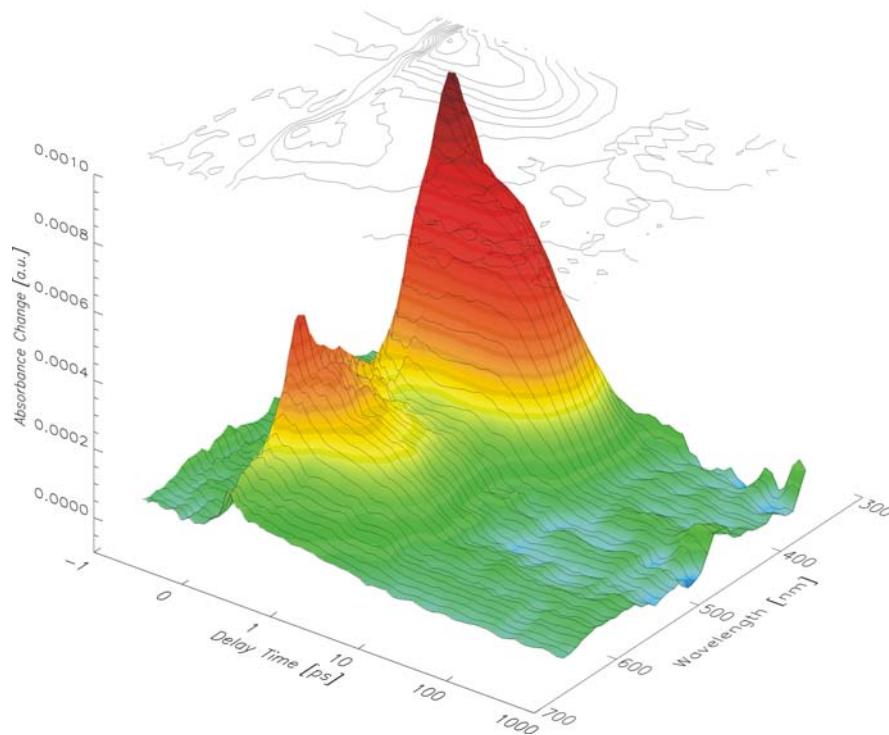


Abbildung 2.18: Transiente Absorptionsänderungen von AMPB (8) in Wasser nach Photoanregung bei 475 nm (*trans* → *cis*). Rot entspricht positiver Absorptionsänderung, blau negativer.

Die Kinetiken von AMPB und dem Azopeptid sind über den gesamten spektralen Bereich sehr ähnlich, so dass in Abbildung 2.19 repräsentativ für alle Wellenlängen die Transienten bei 571 nm ausgewählt wurden, um den direkten Vergleich der transienten Absorptionsänderungen gegen die Verzögerungszeit bei einer Abtastwellenlänge von 571 nm zu betrachten. Bei dieser Wellenlänge erfolgt der Absorptionaufbau innerhalb der Zeitauflösung des Experiments, was einer Population des ersten angeregten Zustandes zugeordnet werden kann. Während die Formation dieses Zustandes in beiden Proben gleich ist, ist die Zerfalldynamik jedoch signifikant unterschiedlich: insgesamt betrachtet

lässt sich sagen, dass die photoinduzierte Dynamik im Azopeptid langsamer ist als im Photoschalter alleine. Dasselbe Ergebnis zeigen die Absorptionsänderungen auch nach Behandlung mit der oben beschriebenen (Kapitel 2.2.5.) globalen Fit-Prozedur.

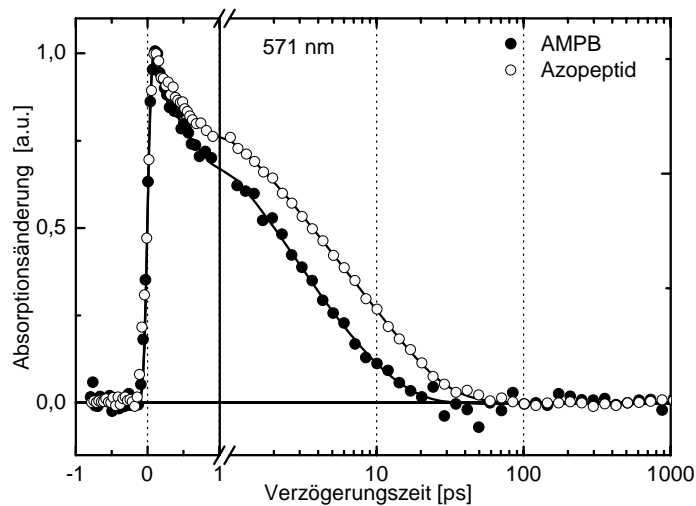


Abbildung 2.19: Vergleich der transienten Absorptionsänderungen des Azopeptids mit AMPB bei einer Wellenlänge von 571 nm (*trans* -> *cis*). Die durchgezogenen Linien repräsentieren die Ergebnisse der multiexponentiellen globalen Fit-Analyse des kompletten Datensatzes. Diese Transiente ist repräsentativ für die gesamte untersuchte spektrale Breite. [72]

Um die Daten passend zu beschreiben, sind 4 Komponenten für beide Systeme nötig: 3 Zeitkonstanten, die die S_1 -Kinetik in der beobachteten Zeitspanne beschreiben und eine lange Zeitkonstante (bezeichnet mit ∞), die mögliche langlebige Photoprodukte berücksichtigt. Die anfängliche schnelle Kinetik in der Größenordnung von einigen hundert fs ist im Falle des AMPB etwas schneller als für das Azopeptid, was sich im globalen Fit-Algorithmus widerspiegelt (Tabelle 2.1). Da aber diese τ_1 Zeitkonstanten so nah an der Zeitauflösung des experimentellen Aufbaus liegen und außerdem in dem Zeitbereich liegen, in dem Lösungsmittelleffekte eine Rolle spielen, müssen hier die absoluten Werte mit Vorsicht interpretiert werden.

	τ_1 (fs)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	τ_4
AMPB (7)	220	1,7	6,6	∞
Azozeptid	230	2	12	∞

Tabelle 2.2: Zeitkonstanten erhalten aus der globalen Fit-Analyse der transienten Absorptionsänderungen (*trans* \rightarrow *cis*) von AMPB und dem Azozeptid. [72]

In beiden Proben kann dieser Zerfall der Photoisomerisation des AMPB-Chromophors zugeschrieben werden. [51] Daraus kann dann der Schluß gezogen werden, dass die Isomerisierung nur wenig von der anschließenden Aminosäurenkette beeinflusst wird, ganz im Gegensatz zu den nachfolgenden Prozessen, die für AMPB deutlich schneller ablaufen, als für das Azozeptid. Während für AMPB Zeitkonstanten extrahiert werden konnten, die mit bereits publizierten [51] in Übereinstimmung liegen, sind sie für das Azozeptid eindeutig anders. Für dieses System zerfällt der angeregte Zustand biexponentiell mit den Zeitkonstanten $\tau_2 = 2$ ps und $\tau_3 = 12$ ps. Das ist etwas langsamer als die entsprechenden Zeitkonstanten, $\tau_2 = 1,7$ ps und $\tau_3 = 6,6$ ps, die für AMPB gefunden wurden. Trotzdem kann man sagen, dass den Amplitudenspektren beider Proben analoge Prozesse zugrunde liegen. In Abbildung 2.20 sind die zugehörigen Amplitudenspektren für das Azozeptid dargestellt.

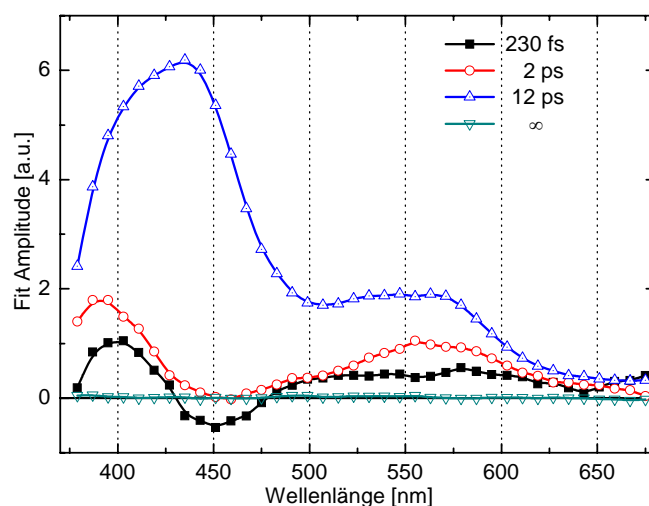


Abbildung 2.20: Amplitudenspektren („decay associated spectra“, DAS) der multiexponentiellen globalen Fit-Analyse für das Azozeptid. [72]

Für beide Prozesse geht die Absorptionsbande des angeregten Zustandes bei 540 nm zumindest teilweise wieder zurück. Die starke Absorptionsänderung um 400 nm geht ebenso teilweise zurück, wird aber deutlich von dem 12 ps Prozeß dominiert. Während die Blauverschiebung bei frühen Verzögerungszeiten die erwartete spektrale Signatur der Schwingungsrelaxation im angeregten Zustand widerspiegelt, ist für die Rotverschiebung der Bande bei 400 nm bei der 12 ps Zeitkonstante eine andere Erklärung nötig: offensichtlich hat der langsamere (12 ps) Zerfall des angeregten Zustandes seinen Ursprung in einem anderen Teil der Potentialenergiefläche des angeregten Zustandes, was in einem anderen Zerfall im Amplitudenspektrum zwischen 400 und 500 nm zum Tragen kommt. In Übereinstimmung mit den spektralen Signaturen findet die interne Konversion zum Grundzustand mit der langsameren Zeitkonstante von 12 ps statt.

2.4. Erste Schritte zur photoschaltbaren Häm-Maquette und Ausblick

Die Ergebnisse, die in Kap. 2.3 vorgestellt wurden, dienten als Basis für weitere Untersuchungen: zunächst wurde versucht, durch Schließen der Disulfidbrücke das Dimer des Azopeptids herzustellen. Hierbei wurde das Azopeptid in wässriger Lösung bei pH 7,5 – 8,5 und in Anwesenheit von NH_4OAc und NH_4HCO_3 gerührt. Da typischerweise der pH-Wert bei dieser Reaktion steigt, muss ca. einmal pro Stunde der pH-Wert wieder mit NH_4OAc eingestellt werden. Die Reaktion ist beendet, wenn der pH-Wert konstant bleibt, was nach ca. 8 Stunden der Fall war. Dabei traten folgende Probleme auf:

- Die Dimerisierung erfolgte nicht vollständig (oder das Dimer war nicht stabil).
- Die Trennung von Monomer und Dimer per HPLC war (bis jetzt) nicht möglich.
- Die freie Sulfidgruppe des noch vorhandenen Monomers reagierte mit der Azogruppe, was zur Spaltung derselben führte (nachgewiesen durch Massenspektroskopie).

Der letzte Punkt war auch ausschlaggebend dafür, dass das Azopeptid für Untersuchungen am Monomer mit einer Schutzgruppe an der Sulfidgruppe des Cysteins versehen wurde, wie in Kap. 2.2.3 beschrieben.

Mit diesem (S-geschützten) Azozeptid wurden bereits weiterführende Experiment unternommen, insbesondere im Hinblick auf die Zugabe von Häm zu dem Azozeptid: es wurden zeitabhängige Absorptionsspektren bei einem festen Potential gemessen.

Hierzu wurde zunächst das Mittelpunktspotential des Häms in wässriger Lösung mit ~10 % DMSO mittels Cyclovoltammetrie bestimmt. Hier wurde das Potential bei -155 mV bestimmt.

Dieses Potential wurde nun eingestellt um Absorptionsspektren zu messen. Zunächst wurde das (S-geschützte) Azozeptid vermessen – es war keine Änderung im Spektrum zu erkennen, woraus man schließen kann, dass ein angelegtes Potential von -155 mV bei dem Azozeptid keine strukturelle Änderung hervorruft (siehe Abbildung 2.21, links oben).

Als nächstes wurde genauso mit dem Häm verfahren. Dieses zeigt die erwartete Reaktion (siehe Abbildung 2.21, rechts oben) innerhalb von ca. 4 min: die Absorption bei 404 nm nimmt ab, während die Absorption bei 435 nm zunimmt. Das entspricht den Absorptionen für die γ -Bande des oxidierten bzw. reduzierten Häms die in der Literatur veröffentlicht sind, wobei eine Blauverschiebung um 10 nm für die γ -Bande des oxidierten, und eine Rotverschiebung um 10 nm für die γ -Bande des reduzierten Häms im Vergleich zu den Messungen, die Robertson *et al.* publiziert haben, zu konstatieren ist. [70] Weiterhin ist ein isosbestischer Punkt bei 419 nm sehr deutlich zu erkennen, sowie die α - und β -Banden des Häms und deren Änderung zwischen 550 und 600 nm.

Interessant war nun, sowohl das Häm wie auch das (S-geschützte) Azozeptid in Lösung (ca. 2:1 Häm:Azozeptid) bei einem angelegten Potential von -155 mV zu vermessen. Wenn die beiden Moleküle nicht miteinander interagieren würden, wäre eine Addition der beiden vorangegangenen Spektren zu erwarten. Wie Abbildung 2.21 (unten) zeigt, ist dies nicht der Fall.

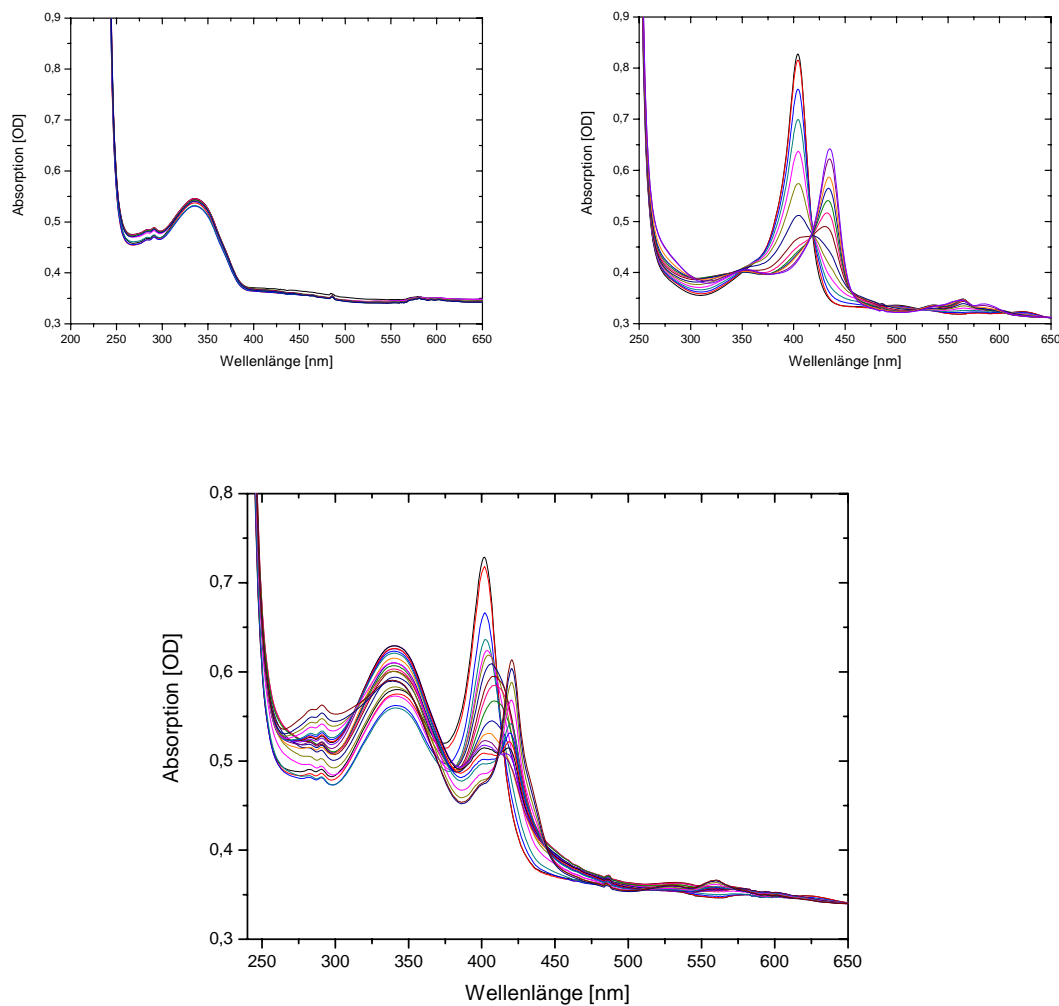


Abbildung 2.21: Zeitabhängige Absorptionsspektren des (S-geschützten) Azopeptids (links oben), des Häms (rechts oben), sowie der einer Mischung der beiden (ca. 2:1 Häm:Azopeptid).

Die Tatsache, dass beide Moleküle offensichtlich miteinander interagieren gibt zu Spekulationen Anlass. Es gibt natürlich viele Möglichkeiten, wie zwei oder mehrere dieser Moleküle miteinander interagieren können, von einem 1:1-Komplex bis zu einem polymerartigen Gebilde. Möglich wäre allerdings auch, dass sich, obwohl hier keine Disulfidbrücke zwischen den zwei Cysteinen möglich ist, ein Konstrukt aus zwei Peptiden, die jeweils mit ihren Histidinen an zwei Häms binden, gebildet hat. Selbst wenn dies der Fall ist, sind immer noch zwei Möglichkeiten denkbar, da die zwei Azopeptide ja nicht unbedingt parallel sondern, da sie nicht verbunden sind, auch antiparallel zueinander stehen können. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass sich die Moleküle in Lösung zu genau dem Konstrukt zusammengelagert haben, welches von

Anfang an geplant war (siehe Abbildung 2.10), obwohl keine Disulfidbrücke zwischen beiden besteht.

Weiterhin wurde versucht, dies mit Redox-Titrationsexperimenten, die mit Azopeptid und Häm (Überschuß Häm) zwischen 200 und -300 mV durchgeführt wurden, zu belegen. Hierbei wurde jedoch nur ein Abbau des Häms beobachtet und nicht, wie zu erwarten war, eine Änderung der Oxidationsstufe des Häms.

Als Ausblick kann man hier sagen, dass diese vorläufigen Ergebnisse positiv für weitere Untersuchungen sind: es ist als gesichert zu betrachten, dass das Azopeptid (oder die Azopeptide) mit der Häm-Gruppe (oder den Häm-Gruppen) interagieren. In welcher Verteilung dies stattfindet bleibt aber zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

Da sich die Disulfidbrücke zwischen den beiden Azopeptiden als unpraktikabel herausgestellt hat, könnte eine Syntheseroute, in der nicht eine Disulfidbrücke die Verbindung zwischen den beiden Peptidketten aufbaut, sondern „einfach“ zwei Methylengruppen diesen Platz einnehmen, möglich sein. Diese wären ähnlich groß wie eine Disulfidbrücke, würden aber eine viel stabilere Bindung ausbilden und wären pH-unabhängig. Allerdings wäre der Syntheseweg hier deutlich schwieriger.

3. *Parvulostat*

3.1. Einleitung

3.1.1. α -Amylaseinhibitoren

In vielen Pflanzen, Mikroorganismen und Tiersekreten kann man α -Amylasen finden. Sie sind eine weit verbreitete Klasse von Enzymen und katalysieren die Hydrolyse der (α -1,4)-glykosidischen Bindung in Amylose, Stärke und vielen anderen Polysacchariden. So besitzen diese Enzyme und ihre Inhibitoren, die α -Amylaseinhibitoren, breite industrielle und medizinische Anwendungen. Es gibt zwei Arten von α -Amylaseinhibitoren: eine Art umfasst Kohlenhydratanaloga wie z.B. Acarbose, die andere Art kleine Proteine. Viele dieser Proteine stammen aus der Gattung der Streptomyces, z.B.: Tendamistat (HOE-467) [76], Z-2685 [77], Haim II [78], Paim I [79], AI-3688 [80], AI-409 [81] und T-76 [82]. Diese Proteine binden an α -Amylase in einer 1:1-Stöchiometrie. Sie sind kompetitive Inhibitoren, die Bindung ist über einen weiten Bereich pH-unabhängig. Weiterhin besitzen sie zwei Disulfidbrücken und die in allen Proteinen konservierte Bindungssequenz WRY. Interessant hierbei ist, dass die 3 Aminosäuren in einer Schleife des Proteins vorliegen und hierbei das hydrophobe Tryptophan lösungsmittelzugänglich vorliegt.

3.1.2. Tendamistat

Tendamistat (HOE-467) ist ein α -Amylaseinhibitor mit 74 Aminosäuren und einem Molekulargewicht MW = 7,956 kDa. Tendamistat konnte aus Kulturüberständen von *Streptomyces tendae* 4158 isoliert werden [76]. Es verfügt über eine hohe thermische Stabilität ($T_m > 80^\circ\text{C}$) und enthält zahlreiche saure Aminosäuren ($pK_I = 4.35$). Die Sekundärstruktur des α -Amylaseinhibitors besteht aus zwei dreisträngigen antiparallelen β -Faltblättern (I: 12-17, 20-27, 52-58; II: 30-37, 41-49, 67-73); innerhalb der Tertiärstruktur sind diese zu einem β -Barrel (+1+3-1-1+3) zusammengelagert [83-85]. Vier Cysteine (11/27 und 45/73), die sequentiell miteinander verbunden sind, bilden zwei unterschiedlich große Schleifen. In der kleineren Schleife (11-27) ist die hoch konservierte

Bindungsstelle des Tendamistats (W18-R19-Y20), mit der es an α -Amylase bindet, in einer Kurven-Region lokalisiert [86].

Tendamistat ist ein sehr gut untersuchtes Protein, so wurde neben der 3D-Strukturlösung durch sowohl NMR [84; 87] als auch Röntgenkristallographie [85], auch seine Struktur im Komplex mit der α -Amylase des Schweinepankreas durch Röntgenkristallographie bestimmt wobei auch die Inhibitions-Konstante von 9×10^{-12} M angegeben wurde [86]. Das Besondere daran war, dass die beiden Strukturen des freien Tendamistats fast gleichzeitig, aber dennoch unabhängig voneinander mit zwei sehr unterschiedlichen Methoden (NMR und Röntgenkristallographie) untersucht wurden. [88] Nachdem beide Strukturen publiziert waren, ging man daher daran sie zu vergleichen, was auch Informationen im Hinblick auf die Qualität der beiden Methoden geben sollte. Das Ergebnis war enorm positiv für beide Methoden, da das Innere der beiden Strukturen praktisch identisch war und auch auf der Oberfläche gab es nur sehr kleine Unterschiede: die meisten Teile der Oberfläche waren in der NMR-Struktur etwas weniger geordnet als in der Kristallstruktur außer Y15, welches da nicht zu sehen war. [89] Des weiteren führte dieser Vergleich auch dazu, einem Lösungsansatz für das Phasen-Problem der Röntgenkristallographie für Proteine zu lösen, deren NMR-Struktur bekannt ist und hierfür als Model benutzt wird. [90]

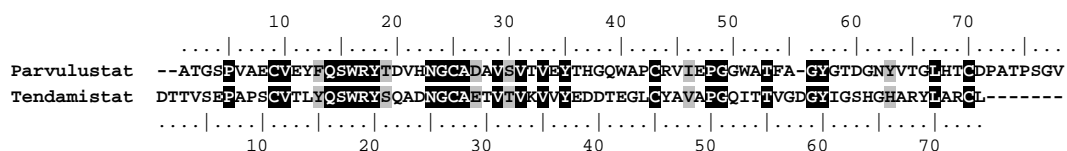
In den 1980er Jahren war Tendamistat für die pharmazeutische Industrie interessant, da man in diesem Protein einen α -Glucosidaseinhibitor gegen *Diabetes mellitus* gefunden zu haben glaubte. Aufgrund seines hohen allergenen Potentials war Tendamistat aber letztlich ungeeignet hierfür. Weiterhin wurden Untersuchungen in Bezug auf den Beitrag der beiden Disulfidbrücken zur Stabilität des Proteins gemacht, unter anderem mit dem erstaunlichen Ergebnis, dass das Öffnen der kleineren Schleife (durch Mutation) mehr zu Destabilisierung des Proteins beiträgt als das Öffnen der größeren Schleife [91; 92].

3.1.3. Parvulostat

Ein anderes Protein aus der Familie der α -Amylaseinhibitoren ist Parvulostat (Z-2685). Es wurde wie die anderen Inhibitoren auch aus Kulturüberständen und zwar von *Streptomyces parvulus* isoliert und zunächst mit einer Länge von 76 Aminosäuren angegeben. Später wurde durch Sequenzierung des

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
GCCACCGGATCCCCGGTTGCGGAGTGC GTGGAGTACTCCAGAGCTGGCGTTACACAGACGTTCAACAACGGGTGCGCCGATGCCGTCTCC									
AlaThrGlySerProValAlaGluCysValGluTyrPheGlnSerTrpArgTyrThrAspValHisAsnGlyCysAlaAspAlaValSer									
91	100	110	120	130	140	150	160	170	180
GTCACGGTCGAGTACACGCACGGCCAGTGGGCCCCCTGCCGCGTGATCGAGCCCGGCGGCTGGGCGACCTTCGCCGGCTACGGAACGGAC									
ValThrValGluTyrThrHisGlyGlnTrpAlaProCysArgValIleGluProGlyGlyTrpAlaThrPheAlaGlyTyrGlyThrAsp									
181	190	200	210	220	230				
GGCAACTACGTCCACGGGCTGCATACCTGCGACCCTGCCACGCCAGCGGCGTCC									
GlyAsnTyrValThrGlyLeuHisThrCysAspProAlaThrProSerGlyVal									

Wie auch Tendamistat besitzt es die konservierte Bindungssequenz WRY sowie zwei sequentielle Disulfidbrücken. In Abbildung 3.2 ist eine Sequenzangleichung von Tendamistat und Parvulustat mit Blosom62 [94] als Matrix dargestellt. Daraus ergeben sich eine Aminosäuren-Identität der beiden Proteine von 29.6 % (schwarz unterlegt) und eine Ähnlichkeit von 37,0 % (grau unterlegt).



Parvulostat und Tendamistat sind zwei typische Vertreter der Protein-basierten α -Amylaseinhibitoren. In Tabelle 3.1 wurden Homologie und Identität zwischen diesen beiden Proteinen und den weiteren bekannten α -Amylaseinhibitoren in Bioedit [95] mit Hilfe von BLOSUM62 [94] dargestellt.

Inhibitor	Herkunft	Größe (Aminosäuren)	Identität (zu Parvulustat)	Ähnlichkeit (zu Parvulustat)	Identität (zu Tendamistat)	Ähnlichkeit (zu Tendamistat)
Parvulustat	<i>S. parvulus</i>	78	100 %	100 %	29.6 %	37.0 %
Tendamistat	<i>S. tendae</i>	74	29.6 %	37.0 %	100 %	100 %
Haim	<i>S. griseosporus</i>	78	38.3 %	42.0 %	29.1 %	36.7 %
Paim	<i>S. corchorusii</i>	73	34.2 %	43.0 %	51.3 %	67.1 %
T-76	<i>S. nitrosporeus</i>	77	68.4 %	78.5 %	31.2 %	43.8 %
AI-409	<i>S. chartreusis</i>	78	71.3 %	77.5 %	35.0 %	43.8 %
MA-4680	<i>S. avermitilis</i>	92	34.8 %	38.0 %	22.6 %	31.2 %
AI-3688	<i>S. aureofaciens</i>	36	33.3 %	38.5 %	25.7 %	31.1 %

Tabelle 3.1: Vergleich von Parvulustat beziehungsweise Tendamistat mit anderen α -Amylaseinhibitoren aus der Gattung der Streptomyceten bezüglich der Identität/Homologie ihrer Aminosäuren in Bioedit mit BLOSUM 62 [94] als Matrix.

Hierbei ergibt sich, dass Parvulustat für die Klasse der Protein-basierten α -Amylaseinhibitoren ein besserer Repräsentant ist als Tendamistat, da Parvulustat höhere Identität / Homologie zu den anderen α -Amylaseinhibitoren aufweist.

Um eine bessere Basis für weitere Studien in der Klasse der α -Amylaseinhibitoren zu gewährleisten, erschien es zu Beginn der vorliegenden Arbeit sinnvoll, strukturelle Untersuchungen an dem repräsentativsten Vertreter dieser Klasse vorzunehmen, um genauere Aussagen über die Klasse der α -Amylaseinhibitoren machen zu können und eventuell noch einen Weg zu finden, um sie für die Medizin mit Blick auf *Diabetes mellitus* nützlich zu machen. So könnte die allergene Wirkung durch Ortsmutagenese umgangen werden, hierzu ist die Aufklärung der Struktur eines weiteren Vertreters der Protein-basierten α -Amylaseinhibitoren nützlich.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Vorbereitung der Proben

Um die 3D-Struktur dieses Proteins bestimmen zu können, wurden ^{15}N - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte Proben von Parvulustat in Milligrammmengen in der Arbeitsgruppe von Prof. Engels von Sigeng Han und Ismail Hassani hergestellt. Die Pufferbedingungen wurden auf der Basis der Zahl der NMR-Signale und einheitlichen Linienbreiten durch Aufnahme von $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQCs optimiert. Die Optimierung ergab eine Konzentration von 0.5 mM Parvulustat, 30 mM Phosphat-Puffer, 167 mM NaCl, 0.01 % NaN_3 und eine optimale

Messtemperatur von 45 °C. Sowohl höhere Konzentration als auch niedrigere Temperatur führten zu Aggregation, wie in Abbildung 3.3 gezeigt ist.

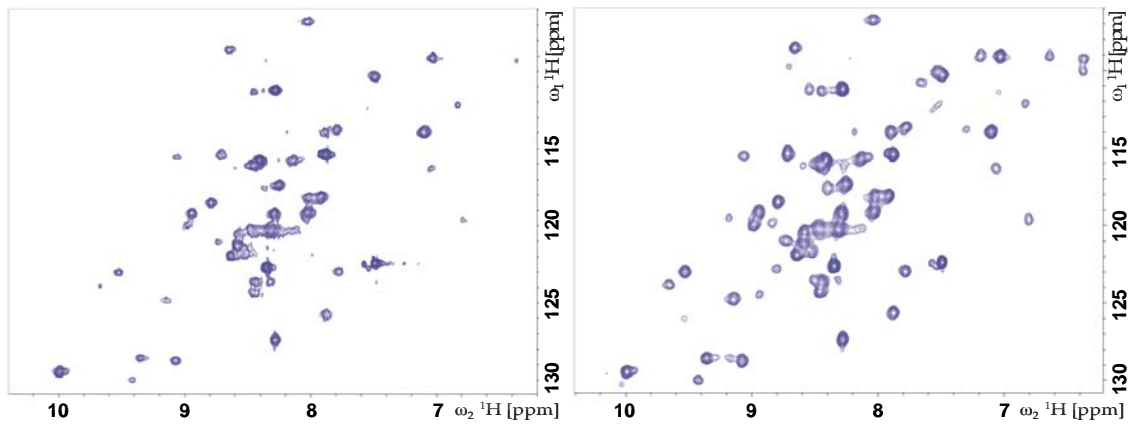


Abbildung 3.3: $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC's bei 37 °C und einer Parvulostat-Konzentration von 1 mM (links) bzw. 0,7 mM (rechts)

Für die Proben wurden Norell 507-HP Standard NMR Röhrchen (Norell Inc., Landisville, NJ, USA) und „Shigemi“ NMR Röhrchen (Shigemi Inc., Allison Park, PA, USA) benutzt. Die Proben wurden alle aus gefriergetrocknetem Protein mit entweder 92.5 % H_2O und 7.5 % D_2O oder 100 % D_2O hergestellt. Die ^1H chemischen Verschiebungen wurden mit TMS auf 0.00 ppm referenziert und die ^{13}C - und ^{15}N -chemischen Verschiebungen wurden aus der ^1H -Frequenz berechnet. [96]

3.2.2. Die NMR-Experimente

Die bei den optimierten Puffer- und Konzentrationsbedingungen durchgeführten einfachen 1D ^1H -NMR- bzw. 2D $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente zeigen gute Dispersion der Amid-NH-Signale (zwischen 6,5 und 10,5 ppm) im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC und Hochfeldverschiebungen einiger Methylgruppen im 1D Protonen-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 3.4). Diese Beobachtungen zeigen, dass das Protein gefaltet ist.

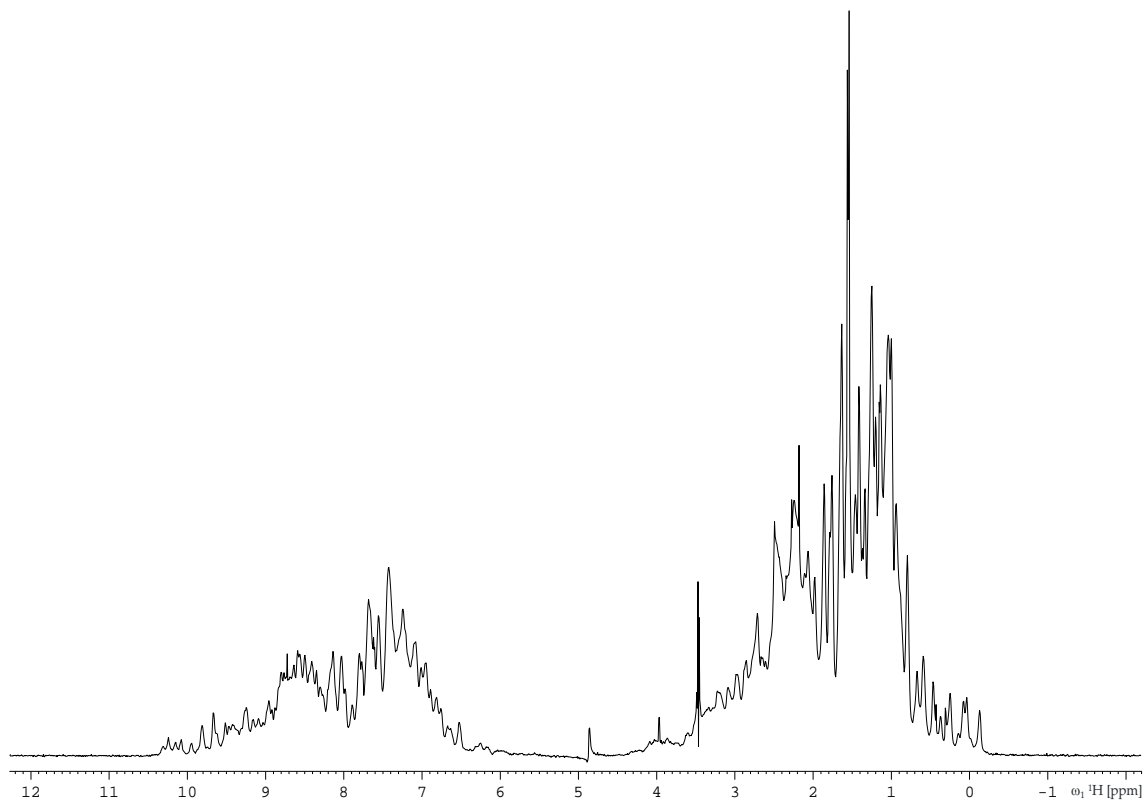


Abbildung 3.4: 1D Protonen-Spektrum von Parvulostat; rechts: aliphatische Region mit Methylgruppensignalen, die auch negative Werte annehmen.

Insbesondere die große chemische Verschiebungsdispersion ist dabei im Einklang mit einer β -Faltblattstruktur des Proteins und deshalb konnten verschiedene 2D- und 3D-NMR-Spektren, sowohl für die Zuordnung der NMR-Resonanzen des Proteins als auch, um Parameter für die anschließende Strukturrechnung zu erhalten, aufgenommen werden. Weiterhin wurden noch Experimente aufgenommen, um die Subnanosekundendynamik des Proteins zu charakterisieren. Alle Experimente wurden an Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe, Deutschland) bei Feldstärken von 600–900 MHz aufgenommen. Für das Aufsetzen und Prozessieren der Spektren wurden die Programme XWIN-NMR 3.5 sowie TOPSPIN 1.3-2.0 (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, Deutschland), verwendet. Für die weitere Auswertung wurden die Programme XEASY [97] sowie SPARKY [98] verwendet.

Im Einzelnen wurden folgende Experimente aufgenommen und ausgewertet:

1.) NMR-Spektren zur Resonanzzuordnung:

HNCO [99; 100], HNCA [100; 101], HNCACB [102; 103], CBCACONH [101], HBHACONH [102; 104], HCCH-TOCSY [105]

2.) NMR-Spektren mit Strukturinformationen (NOEs):

^{15}N -NOESY-HSQC [106], ^{13}C -NOESY-HSQC [107-109], $3\times {}^1\text{H}, {}^1\text{H}$ -NOESY [110-113] (Mischzeiten: 150ms, 100ms, 50ms) in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ / 92.5:7.5, ${}^1\text{H}, {}^1\text{H}$ -NOESY in D_2O

3.) NMR-Spektren für Dynamikcharakterisierung:

Skalare Kopplungen: HNHA [114; 115]

Relaxationsmessungen: ^{15}N - T_1 , $-T_2$, $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -heteronuklear NOE

Austauschexperimente: Zeitserie von HSQC's (SOFAS-HMQC [116]) nach Initiierung von Austausch

	NS	TD1	TD2	TD3	SW ω_3	SW ω_2	SW ω_1	SI ω_3	SI ω_2	SI ω_1	RD	τ_M
HNCO	8	144	76	2048	9842.520 (^1H)	1915.813 (^{15}N)	2641.333 (^{13}C)	1024	128	512	1.5	-
HNCA	16	82	58	2048	8389.262 (^1H)	1580.607 (^{15}N)	6033.924 (^{13}C)	2048	256	512	1.45	-
HNCACB	16	170	60	2048	8389.262 (^1H)	1580.607 (^{15}N)	12067.70 2 (^{13}C)	2048	256	512	1.5	-
CBCACONH	16	170	68	2048	9765.625 (^1H)	1844.856 (^{15}N)	14085.19 4 (^{13}C)	2048	256	512	1.5	-
HBHACONH	8	256	66	2048	8389.262 (^1H)	1580.605 (^{15}N)	8389.262 (^1H)	2048	128	512	1.5	-
HCCH-TOCSY	4	160	120	1024	8389.262 (^1H)	5747.126 (^{13}C)	4500.000 (^1H)	1024	256	1024	1.4	-
HNHA	32	56	112	2048	7183.908 (^1H)	7183.908 (^{15}N)	1581.266 (^1H)	2048	256	512	1.45	-
^{15}N -NOESY-HSQC	8	232	80	2048	11160.714 (^1H)	2189.326 (^{15}N)	8801.472 (^1H)	2048	256	512	2.0	150
^{13}C -NOESY-HSQC	8	160	144	2048	12626.263 (^1H)	9506.450 (^{13}C)	5850.859 (^1H)	2048	512	512	1.5	130
${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -NOESY (H_2O)	112	1024	2048	-	-	9920.635 (^1H)	9901.455 (^1H)	-	2048	1024	1.93	150
${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -NOESY (H_2O)	72	1024	2048	-	-	9920.635 (^1H)	9901.455 (^1H)	-	2048	1024	1.93	100
${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -NOESY (H_2O)	96	1024	2048	-	-	9920.635 (^1H)	9901.455 (^1H)	-	2048	1024	1.93	50
${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -NOESY (D_2O)	64	1504	2048	-	-	9920.635 (^1H)	9901.455 (^1H)	-	2048	2048	2.0	325

Tabelle 3.2: NMR Experimente mit Parvulostat: NS: Anzahl der akkumulierten FIDs, TD: Anzahl der aufgenommenen komplexen Datenpunkte, SW: spektrale Breite in den Dimensionen ω_1 , ω_2 und ω_3 , SI: Zahl der Punkte nach Fourier Transformation in ω_1 , ω_2 und ω_3 , RD: Relaxationswartezeit (s), τ_M : Mischzeit (s)

3.2.3. Auswertung der NMR-Experimente

3.2.3.1. Überblick

Die Analyse der NMR-Spektren lässt sich in zwei Teile gliedern:

a) die Zuordnung der NMR-Resonanzen

Hier wird jedem Kern ein Resonanzsignal zugeordnet, d. h. man definiert anhand von typischen chemischen Verschiebungen zu welchem Kern in welcher Aminosäure des Proteins die entsprechende Resonanz gehört. Hieraus weiß man dann bei welcher chemischen Verschiebung man welchen Kern zu erwarten hat, man erhält eine sequenzspezifische Resonanzzuordnung (Assignment). Diese ist Voraussetzung für den zweiten Teil. Hier gibt es nun verschiedene Strategien: für ein Protein, das nicht mit ^{15}N oder ^{13}C angereichert ist, wie es z. B. bei Tendamistat der Fall war, werden COSY/TOCSY- und NOESY- oder ROESY-Spektren verwendet. Die verschiedenen Spin-Systeme werden in den COSY- und TOCSY-Spektren identifiziert. NOESY- oder ROESY-Spektren werden für die sequentielle Zuordnung der individuellen Spin-Systeme verwendet. Hat man allerdings, wie hier bei Parvulostat, die Möglichkeit, ein Protein einheitlich mit ^{15}N und / oder ^{13}C anzureichern, ergibt sich daraus eine neue Dimension in der man eine Frequenz erhält, da die Stickstoffatome nun für NMR „sichtbar“ sind. Diese Möglichkeit der Anreicherung bestimmter Isotope in Proteinen war eine große Hilfe für die Strukturaufklärung, da somit 3D-Spektren aufgenommen werden konnten und somit das Problem der Überlappung verschiedener Signale in einer Dimension zu großen Teilen gelöst werden konnte. [117]

b) NMR-Experimente mit Strukturinformation

Anhand der Resonanzzuordnung können dann die Kreuzsignale der NOESY-Spektren den entsprechenden Protonen zugeordnet werden. Aus den Intensitäten dieser NOE-Kreuzsignale lassen sich dann die Abstände zwischen zwei Protonen errechnen, welche die Grundlage für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Proteins sind.

Weiterhin wurden noch weitere Spektren mit anderen Parametern für die Strukturbestimmung des Proteins aufgenommen, die dann ebenfalls als Parameter bei der Berechnung der Struktur von Parvulostat mitaufgenommen wurden: skalare Kopplungen, Relaxationsmessungen (^{15}N), sowie Experimente für den H/D-Austausch der Amid-Protonen.

3.2.3.2. Die Resonanzzuordnung

3.2.3.2.1. Das Proteinrückgrat

Für die Resonanzzuordnung der einzelnen Atome im Proteinrückgrat wurden Tripelresonanz-Experimente (HNCACB, HNCA, HNCO, CBCACONH und HBHACONH) an einer $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Probe bei 318 K an einem 600 bzw. 700 MHz-Spektrometer gemessen. Ihre wichtigsten Vertreter sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Sie stellen eine Verbindung zwischen den Atomen benachbarter Aminosäurereste her. Das wichtigste Tripelresonanz-Experiment stellt das HNCACB dar, in welchem $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ - und $^{15}\text{N}_{\text{H}_i}$ -Kerne mit $^{13}\text{C}_{\alpha,i-}$, $^{13}\text{C}_{\beta,i-}$, $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ und $^{13}\text{C}_{\beta,i-1-}$ -Kernen korreliert werden. Ausgehend vom $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ -Kern wird die Magnetisierung zuerst auf den skalar koppelnden Stickstoffkern transferiert. Von dort wird sie auf die $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -Kerne, dann auf die $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Kerne und wieder zurück auf das $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ -Kern übertragen. Da die skalare Kopplung des Stickstoffkerns mit dem $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ -Kern und mit dem $^{13}\text{C}_{\alpha,i-}$ -Kern mit 7 Hz, bzw. 11 Hz nahezu gleich groß ist, erfolgt der Magnetisierungstransfer vom Stickstoffkern sowohl zum $^{13}\text{C}_{\alpha,i-}$ -Kern als auch zum $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ -Kern. Daher erhält man aus diesem Experiment intraresiduale Korrelationen des $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ -Kerns mit den $^{13}\text{C}_{\alpha,i-}$ und $^{13}\text{C}_{\beta,i-}$ -Kernen, sowie interresiduale Korrelationen mit den $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ und $^{13}\text{C}_{\beta,i-1-}$ -Kernen. Im HNCA hingegen werden nur die $^{13}\text{C}_{\alpha,i-}$ und $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ -Kerne betrachtet, im HNCO nur die $^{13}\text{C}'_{i-1}$. Im Fall des CBCA(CO)NH-Experiments, das zur Aufklärung von überlappenden Korrelationen im HNCACB aufgenommen wurde, erhält man interresiduale Korrelationen zwischen den $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ - und $^{15}\text{N}_{\text{H}_i}$ -Kernen und den $^{13}\text{C}_{\alpha,i-1-}$ und $^{13}\text{C}_{\beta,i-1-}$ -Kernen. Im HBHACONH hingegen werden die $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ - und $^{15}\text{N}_{\text{H}_i}$ -Kerne mit den $\text{H}^{\alpha/\beta}_{i-1}$ -Kernen korreliert. Im Idealfall sollte man aus den in vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimenten die komplette Zuordnung des Protein-Rückgrats (H^{N} , N^{H} , C' , C_{α} , C_{β} , H_{α} und H_{β}) erhalten.

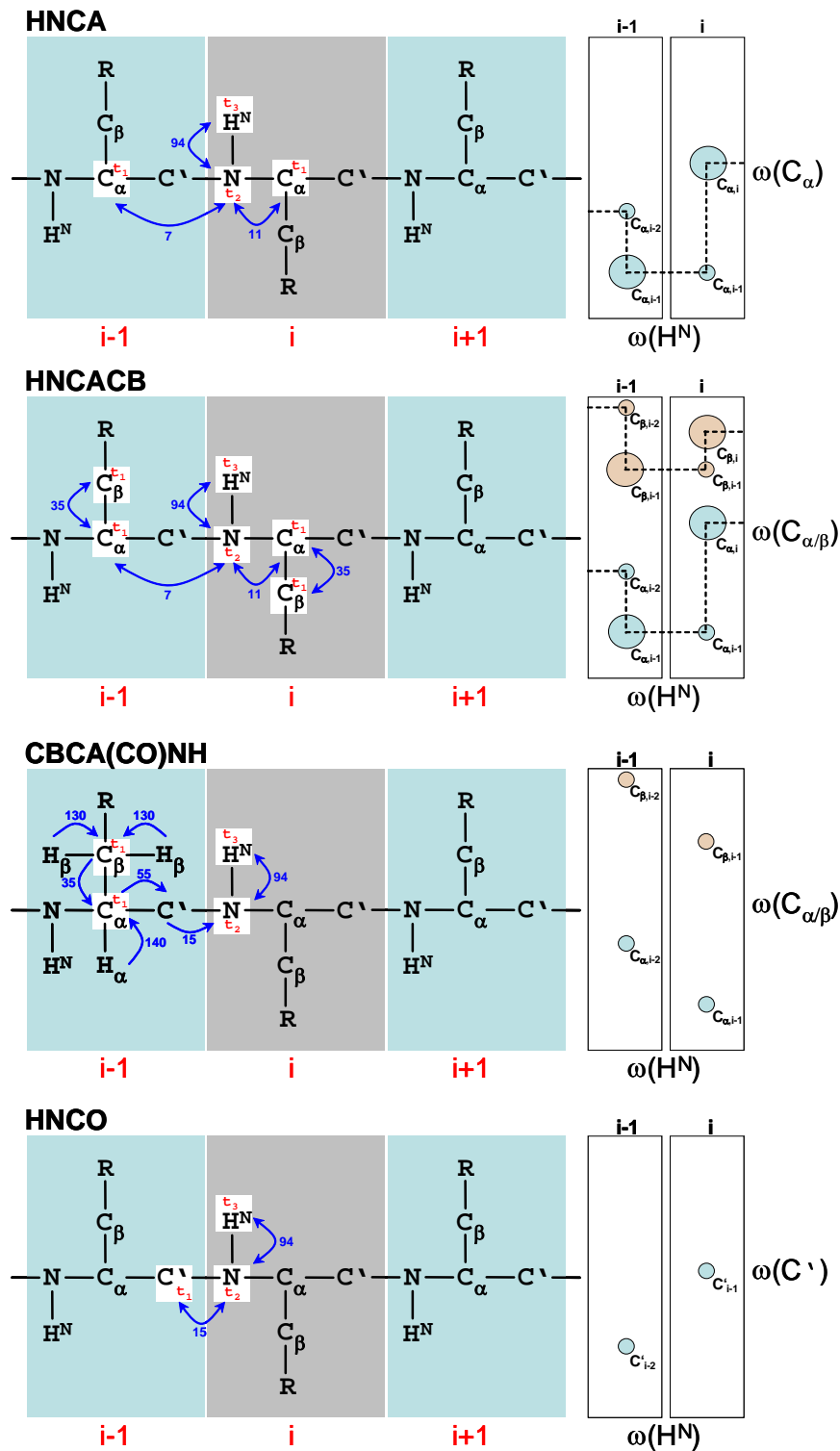


Abbildung 3.5: Wichtige NMR-Proteinrückgrat-Experimente, der Resonanztransfer ist mit blauen Pfeilen gekennzeichnet, die Kopplungskonstanten sind ebenfalls in blau angegeben. Die detektierten Kerne sind durch weiße Boxen gekennzeichnet und die entsprechenden Detektionszeiten (t_1 , t_2 und t_3) sind angegeben. Das typische Resonanzmuster bestimmter Ebenen ist für jeweils benachbarte Aminosäuren (i , $i-1$) rechts dargestellt (modifiziert nach Duchardt [118] und Schlörb [119]).

3.2.3.2.2. Die Proteinseitenketten

Um neben den Resonanzen des Rückgrats auch die der Seitenketten der Aminosäuren zu bestimmen wurden bereits in einem HBHACONH die Resonanzen der $H_{\alpha/\beta}$ erhalten. Diese sind gemeinsam mit den bereits erhaltenen $C_{\alpha/\beta}$ -Resonanzen als Startpunkte für die Auswertung des Experiments benutzt worden, mit dem die weitere Resonanzzuordnung der einzelnen Atome in den Proteinseitenketten vorgenommen wurde: das HCCH-TOCSY Experiment, wie es in Abbildung 3.6 dargestellt ist.

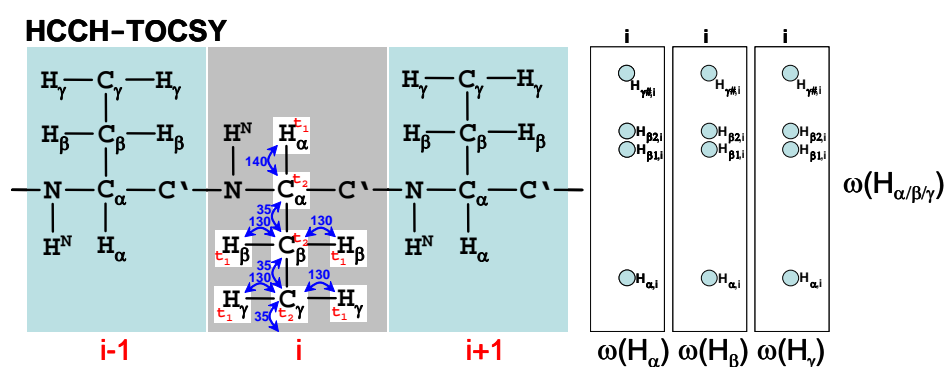


Abbildung 3.6: HCCH-TOCSY-Experiment, der Resonanztransfer sowie die Kopplungskonstanten sind blau gekennzeichnet. Die detektierten Kerne sind durch weiße Boxen gekennzeichnet und die entsprechenden Detektionszeiten (t_1 und t_2) sind angegeben (rot). Das typische Resonanzmuster bestimmter Ebenen ist für jeweils benachbarte Aminosäuren (i , $i-1$) rechts dargestellt.

In diesem werden die $^1H_{N_i}$ - und $^{15}N_{H_i}$ -Kernen mit allen aliphatischen $^{13}C_i$ - und 1H_i -Signalen korreliert. Somit lässt sich aus diesem Experiment das gesamte (aliphatische) Seitenkettengefüge des Proteins bestimmen - sofern man die Startpunkte $H_{\alpha/\beta}$ und $C_{\alpha/\beta}$ vorher bestimmt hat. Um noch Informationen über die aromatischen Seitenketten zu erhalten, wurde ein 1H - 1H -NOESY in D_2O aufgenommen, so dass die Signale der aromatischen Protonen nicht von den Amid-Proton-Signalen überlagert werden und so zugeordnet werden können.

3.2.3.3. Distanzinformation aus NOESY-Spektren

Für die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ist der NOE-Effekt das wichtigste Mittel, da sich durch diesen Effekt die interatomaren Abstände aus den Kreuzsignalintensitäten ableiten lassen. Diese Distanzangaben erhält man aus NOESY-Experimenten (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy), die auf der dipolaren Wechselwirkung des Kernspins durch den Raum (NOE-Effekt) basieren. Die Intensität des NOE (I_{xy}) ist proportional zum Abstand der beteiligten Kerne (r).

$$I_{xy} \approx r_{xy}^{-6}$$

Aus diesem Grund ist Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen nur dann vorhanden, wenn die Distanz der Kerne weniger als 5 Å beträgt. Man sieht daher Korrelationen von Protonen, die in der Primärstruktur sequentiell benachbart sind, oder Protonen, die aufgrund der Tertiärstruktur in räumliche Nähe zueinander gelangen. Die hier erlangten Daten bilden nachfolgend die Grundlage für die Berechnung der Struktur.

3.2.3.4. Torsionswinkelinformation aus skalaren Kopplungskonstanten

Die homonuklearen Kopplungen über 3 Bindungen zwischen H_α und H^N , $^3J(\text{HNHA})$, wurden mit einem 3D HNHA-Experiment [114; 115] gemessen. Die Kopplungskonstanten wurden durch das Verhältnis zwischen dem Kreuzsignal (I_c) und dem Diagonalsignal (I_d) erhalten:

$$^3J = (\arctan - (I_c/I_d))^{1/2} / (\pi(\delta + \delta'))$$

wobei $(\delta + \delta')$ die Wartezeit in der Pulssequenz beschreibt in der die H^N - H_α Kopplung aktiv ist (3D HNHA: $(\delta + \delta') = 25$ ms). Das Pulsprogramm benutzt eine Aquisitionszeit in der t_2 -Dimension, die viel kürzer als die transversale Relaxationszeit von sowohl H^N als auch von H_α . Die Linienform in der F2-Dimension ist daher hauptsächlich von der Apodisierungsfunktion bestimmt, weswegen die Linienformen der Kreuz- sowie Diagonalsignale identisch sind

und deren Intensitätsverhältnis eine direkte Messung der Kopplungskonstanten ermöglicht.

3.2.3.5. Relaxationsmessungen

^{15}N -Relaxationsparameter (longitudinale Relaxationsraten ($R_1 = 1/T_1$), transversale Relaxationsraten ($R_2 = 1/T_2$) und heteronukleare ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -Het-NOEs wurden an Parvulostat gemessen (alle bei 600 MHz), um die Korrelationszeit für die generelle Molekülbewegung zu bestimmen sowie die lokale Rückgratdynamik im Subnanosekundenbereich. Für den N-Terminus (Aminosäuren 1-5) sowie für die Aminosäuren 14, 16 und 17 wurden keine Werte erhalten, da die NMR-Signale verbreitert sind und damit nicht mehr detektiert werden konnten. Weiterhin gelang es nicht für die Aminosäuren 24, 25, 26 und 39 aufgrund starker Signalüberlappung Werte zu erhalten. Die Aminosäuren 15 und 59 wurden nicht für die Het-NOE-Analyse berücksichtigt, da hier das Signal-Rausch-Verhältnis zu schlecht war. Für die R_1 -Raten wurde eine Serie von Spektren mit Wartezeiten von 10, 20, 80, 120, 200, 400, 600, 800, und 1000 ms aufgenommen. Für die R_2 -Raten wurde folgende Relaxationswartezeiten benutzt: 15,7, 31,4, 47,0, 62,7, 78,4, 109,8, 141,1, 188,2, 235,2, 313,6 und 1000 ms. Die heteronukleare ^{15}N - $\{^1\text{H}\}$ -Het-NOE wurden aus dem Verhältnis der Signalintensitäten ($I_{\text{on}}/I_{\text{off}}$) mit und ohne Sättigung der Amid-Protonen bestimmt. Die Berechnung der Dynamik erfolgte mit den Programmen TENSOR 2.0 [120] und Model-free [121; 122] unter Verwendung der HetNOE- Werte und des T_1/T_2 -Verhältnisses. Hierbei wird die Dynamik des Proteins als Ordnungsparameter (S^2) dargestellt.

3.2.4. Strukturrechnungen mit ARIA

Die NOE-Signale, die in den NOESY-Spektren identifiziert wurden, werden in Tabellenform als Eingangswerte für das Strukturberechnungsprogramm ARIA 1.2 [123] verwendet (siehe Appendix). Die ersten Berechnungen wurden mit unzweideutigen NOE-Signalzuordnungen durchgeführt, die daraus erhaltenen Strukturen wurden verbessert, indem mögliche NOE-Signalzuordnungen, basierend auf Distanzen der nachfolgenden Verfeinerungen, eingeführt wurden. Alle Berechnungen wurden mit CNS 1.1 [124] unter Verwendung des

Aufbaus und der Protokolle von ARIA 1.2 durchgeführt und das Protein allhdg 5.3 Kraftfeld [125] wurde mit PROLSQ Parametern benutzt. Die ARIA-Protokolle wurden dahingehend geändert, dass es möglich wurde mehr als 5 Spektren so wie halb-zugeordnete NOE-Signalzuordnungen (nur in zwei von drei Dimensionen) zu verwenden. Nach jeder der 8 Iterationen (0-7), in welchen jeweils 50 Strukturen berechnet wurden, werden die NOE-Distanzwerte basierend auf den 10 energieärmsten Strukturen von ARIA nochmals kalibriert. Die Toleranzgrenze wurde schrittweise bis zu 0.1 Å in der letzten Iteration (Iteration 8) reduziert. In dieser wurden dann 200 Strukturen berechnet. Für die Strukturberechnungen wurde ein vierstufiges *simulated annealing* (SA) Protokoll und die Torsionswinkeldynamik (TAD) benutzt. Die Hochtemperaturphase bestand aus 10000 Schritten bei 10000 K. Hierauf folgten drei Abkühlphasen: 8000 Schritte bei 2000 K, 5000 Schritte bei 1000 K und 10000 Schritte bei 50 K. Während des SA-Protokolls wurde die Kraftkonstante für die NOE-Signale und die Wasserstoffbrückenbindungen auf 10 kcal/mol·Å² während der Hochtemperaturphase und 50 kcal/mol·Å² während der Abkühlphasen gesetzt. Zum Schluss wurden die 20 energieärmsten Strukturen weiter mit Procheck analysiert, sowie in detailliertem Wasser verfeinert.

Neben den NOE-Signalen wurden auch ϕ und ψ Diederwinkel für die Berechnungen benutzt. Diese wurden aus Talos [126] extrahiert, für das die chemischen Verschiebungen von ¹H_N, ¹H_α, ¹⁵N, ¹³C', ¹³C_α und ¹³C_β benutzt wurden. Insgesamt wurden 35 ϕ und ψ Diederwinkel benutzt, die auf sicheren Vorhersagen beruhten. Die Kraftkonstanten für die ϕ und ψ Diederwinkel wurden auf 5 kcal·mol⁻¹·rad⁻² für die Hochtemperaturphase und auf 25 und 200 kcal·mol⁻¹·rad⁻² für die beiden Abkühlphasen gesetzt. Weiterhin wurden 51 ³J (HNHA) Kopplungskonstanten über die Karplusgleichung direkt mit einer Kraftkonstante von 0 kcal·mol⁻¹·Hz⁻² für die Hochtemperaturphase und 0,2 und 1,0 kcal·mol⁻¹·Hz⁻² für die beiden Abkühlungsphasen eingesetzt. Des Weiteren wurden 51 T₁/T₂-Raten, die aus der Analyse der heteronuklearen Relaxationswerte erhalten wurden, mit einer Kraftkonstante von 1 kcal·mol⁻¹ benutzt. Die T₁/T₂-Raten, deren hetNOE-Werte ≤ 0,5 waren, sowie die Raten der Aminosäuren in flexiblen Regionen des Proteins wurden nicht benutzt. Die Diffusionstensoranisotropie und Rhombizitätskomponenten sowie die Rotationskorrelationszeit wurden mit Tensor2 [120] abgeschätzt. Der Diffusionstensor wurde durch eine Gittersuche, basierend auf den berechneten Strukturen nach jeder Iteration, optimiert. Am Ende wurden die 20 Strukturen

mit der niedrigsten Energie mit Procheck 3.5.4 [127; 128] weiter analysiert und mit OPLS-Parametern in detailliertem Wasser verfeinert.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Die Resonanzzuordnung in Parvulostat

3.3.1.1. Das Proteinrückgrat von Parvulostat

Mit der wie oben beschrieben hergestellten Probe (0.5 mM Parvulostat, 30 mM Phosphat-Puffer, 167 mM NaCl, 0.01 % NaN_3) wurde als erstes ein bezüglich der Anzahl der NMR-Signale und der Linienbreite zufrieden stellendes ^1H , ^{15}N -HSQC aufgenommen, wobei ein besonderes Augenmerk der Dispersion der Signale galt, da diese in den 3D-Experimenten ausgenutzt wird. In diesem Spektrum erwartet man die Amid-Rückgrat-Resonanzen der Aminosäuren des Proteins, sowie die Signale der Seitenketten von Asparagin (2x), Glutamin (2x) und Arginin (2x), ebenso wie Signale der H_ϵ -Protonen der Tryptophane (3x). Parvulostat besitzt 78 Aminosäuren, von denen von der N-terminalen Aminosäure typischerweise keine Resonanz erwartet wird, da sie sich mit dem Lösungsmittel in schnellem Austausch befindet. Weiterhin besitzen Proline kein Amid-Proton und können somit auch kein Signal in diesem Spektrum erzeugen. Parvulostat besitzt 5 Proline, daher ergibt sich eine Anzahl von 72 an zu beobachtenden Amid-Rückgrat-Signalen. Im Spektrum (siehe Abbildung 3.7, oben) beobachtet wurden 67 Signale (93%; es fehlen: 1, 3, 4, 14, 16, und 17), weiterhin sind die Resonanzen von zwei der drei Tryptophan-Seitenketten (40 und 51) zu sehen, ebenso wie vier weitere Seitenketten-Paare (durch eine Linie verbunden).

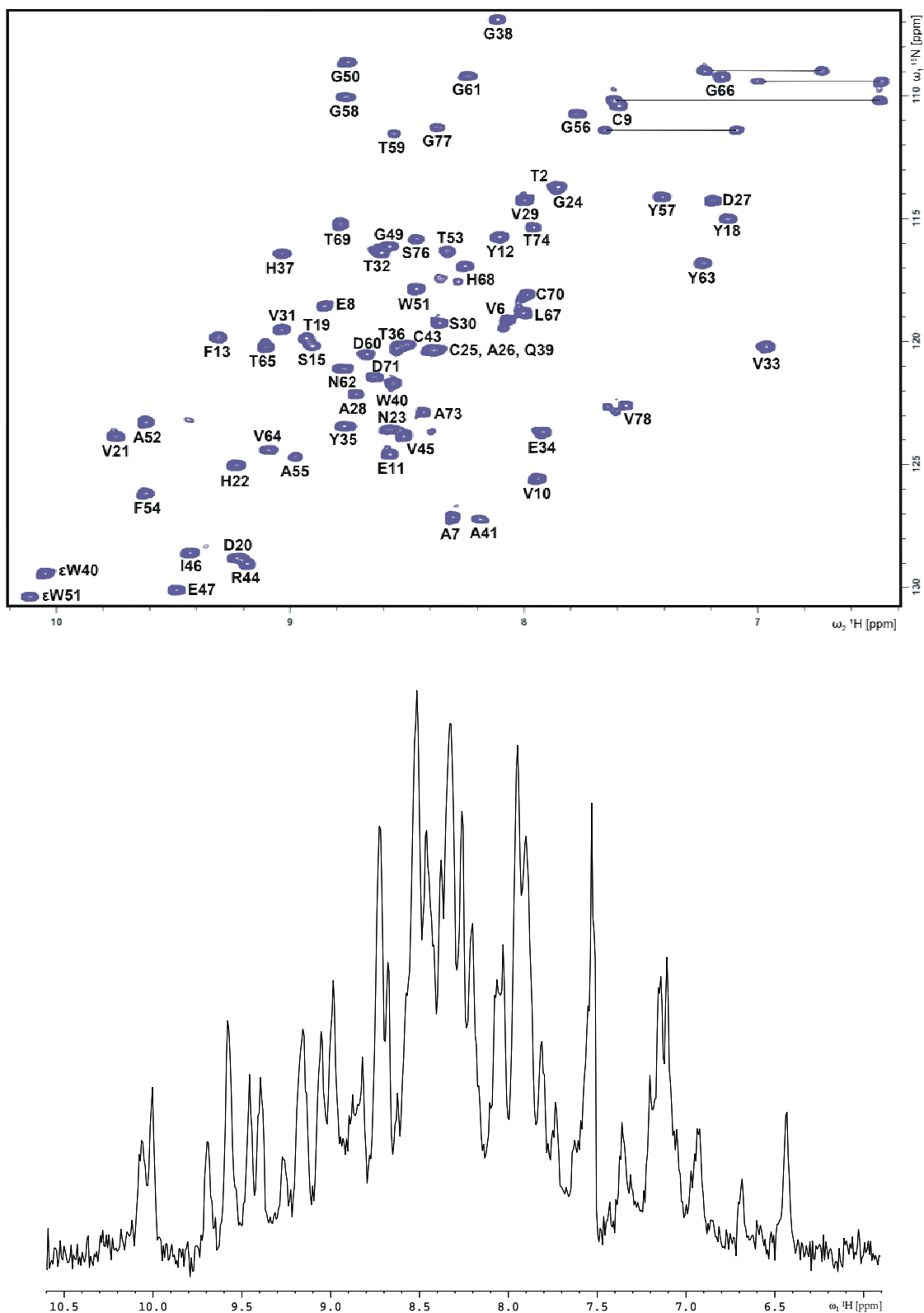


Abbildung 3.7: Oben: 600 MHz ^1H - ^{15}N HSQC von Parvulostat (0.5 mM in 92.5 % H_2O /7.5 % D_2O , 30 mM Phosphat-Puffer (pH 6.6), 170 mM NaCl und 0.01 % NaN_3 bei 45 °C. Alle gefundenen Rückgrat- ^1H , ^{15}N -Signale sind markiert, ebenso wie die H_α -Protonen von W40 und W51. Unten: 1D Protonen-Spektrum von Parvulostat, extrahiert aus dem oben stehenden ^1H - ^{15}N HSQC: gezeigt ist die Region mit Amid-Protonen und Aromaten

Um die Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC den Aminosäuren in der Proteinsequenz zuordnen zu können, ist es nötig weitere Experimente aufzunehmen und zuzuordnen, für die die Bedingungen des $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC's als Grundlage dienen. Die im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC gefundenen Signale entsprechen dann den Diagonalsignalen von denen aus die anderen Signale zugeordnet werden. Hierfür wurden folgende Spektren aufgenommen: HNCACB, HNCA, HNCO, CBCACONH und HBHACONH. In diesen 3D-Experimenten ist es nun möglich die verschiedenen Resonanzen von $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_{\alpha}$, $^{13}\text{C}_{\beta}$, $^{13}\text{C}'$, $^1\text{H}_{\alpha}$ sowie $^1\text{H}_{\beta}$ in „Streifen“, die man aufgrund der Dispersion im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC erhält, aufzulösen, auch ohne dass man die Identität der entsprechenden Spin-Systeme kennt. Weiterhin ist es in diesen Spektren möglich, durch ^1J und ^2J Kopplungen die Korrelation zwischen den Aminosäuren zu finden. Für die Zuordnung dieses Proteins, die komplett mit XEASY [97] durchgeführt wurde, war das HNCACB (siehe Abbildung 3.8, links) von besonderer Wichtigkeit, da man aus diesem Spektrum die meiste Information gewinnen konnte ($^{13}\text{C}_{\alpha}$ und $^{13}\text{C}_{\beta}$ von Aminosäure i und $(i-1)$). Erleichtert wird dies durch charakteristische chemische Verschiebungen bestimmter Aminosäuren, die dadurch besonders leicht zu identifizieren sind. Hierzu zählen Glycine, deren ^{15}N chemische Verschiebung einen recht kleinen Wert (~ 110 ppm) aufweist, sowie einen sehr niedrigen Wert für $^{13}\text{C}_{\alpha}$ (~ 3.9 ppm) und kein $^{13}\text{C}_{\beta}$. Weiterhin sind Alanine einfach zu erkennen, da sie über einen sehr niedrigen Wert des $^{13}\text{C}_{\beta}$ (~ 19 ppm) verfügen. Außerdem sind die $^{13}\text{C}_{\beta}$ -Werte für Serin und Threonin aufgrund ihrer Nähe zum sehr elektronegativen Sauerstoff und einem daher relativ weit ins Tieffeld verschobenen Wert (~ 64 bzw. ~ 70 ppm) leicht von allen anderen zu unterscheiden. Durch diese „Hilfen“ und einzigartige Positionen dieser speziellen Aminosäuren in der Sequenz, wie etwa zwei Glycine hintereinander (hier z.B.: G49 und G50), war es möglich viele der zu sehenden Aminosäuren zuzuordnen. Ein weiterer wichtiger Baustein für die komplette Sequenzzuordnung war das CBCACONH (siehe Abbildung 3.8, rechts), da hier die interresidualen Signale $(i-1)$, die im HNCACB nur sehr schwach oder gar nicht zu sehen waren sichtbar wurden, wodurch die Zuordnung komplettiert werden konnte. Ebenso konnten hierdurch Überlagerungen von Signalen aufgelöst werden. Das HBHACONH war es ebenfalls hilfreich, da hier die teilweise ebenso spezifischen Protonen-Signale zugeordnet werden konnten und somit die Kohlenstoffzuordnungen bestätigt werden konnten. Die Zuordnung der $^1\text{H}_{\alpha}$ - und $^1\text{H}_{\beta}$ -Protonen ist auch für die weitere Vorgehensweise in der Zuordnung des Proteins wichtig, die dann nicht mehr auf dem $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -

HSQC basiert, sondern auf dem ^1H , ^{13}C -HSQC. Komplettiert wurde die Protein-Rückgrat-Zuordnung durch das HNCO, in dem die C' -Signale zugeordnet wurden. Insgesamt wurden durch diese Experimente 85 % der C' , 95 % der C_α , 96 % der C_β , 94 % der H_α und 91 % der H_β zugeordnet. Die restlichen Resonanzen waren entweder nicht im ^1H , ^{15}N -HSQC zu sehen oder nicht in den spezifischen 3D-Spektren, zum Teil auch weil das für den „Streifen“ nötige Amid-Proton aufgrund eines Prolins an dieser Position nicht vorhanden war.

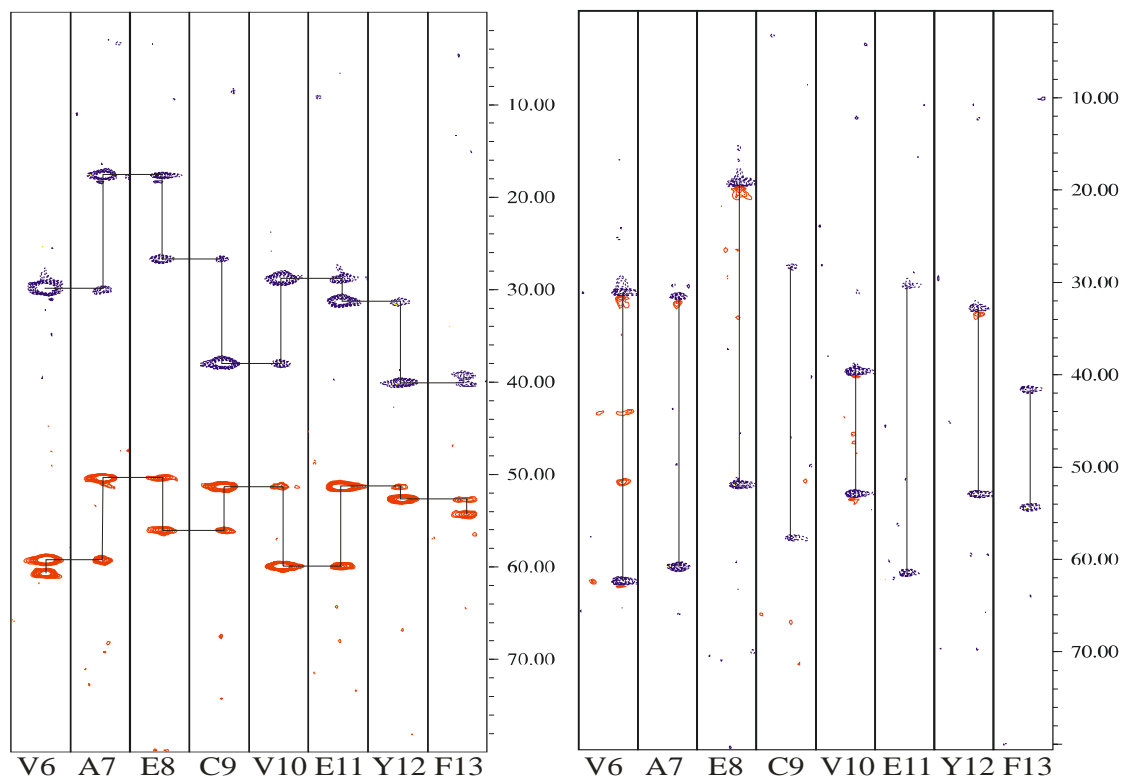


Abbildung 3.8: Die $[\omega_1(^1\text{H}), \omega_3(^1\text{H})]$ „Streifen“ wurden für die Aminosäuren V6-F13 aus dem HNCACB-Spektrum (links) und dem CBCACONH-Spektrum (rechts) extrahiert. Rote Signale sind positiv, blaue negativ. Im HNCACB sind die Konnektivitäten der Signale untereinander mit einer Linie verbunden. Links: rot, groß: $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}_\alpha$ -Signal der unten angegebenen Aminosäure x; rot, klein: $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}_\alpha$ -Peak der Aminosäure x-1; blau, groß: $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}$ -Peak der unten angegebenen Aminosäure x; blau, klein: $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}_\beta$ -Peak der Aminosäure x-1. Rechts: $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}_\alpha$ -, bzw. $^1\text{H}^\text{N}/\text{C}_\beta$ -Peak der Aminosäure x-1.

3.3.1.2. Die Seitenkettenzuordnung in Parvulostat

Der nächste Schritt war nun, nachdem das Rückgrat des Proteins zugeordnet war, die einzelnen Aminosäuren komplett zuzuordnen, also deren Seitenketten. Hierfür wurde ein HCCH-TOCSY aufgenommen, in dem man alle aliphatischen Seitenketten sehen kann. Für die Zuordnung wurden nun die $^{13}\text{C}_\alpha/{}^1\text{H}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta/{}^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen aus den Rückgrat-Experimenten in XEASY [97] in einer Datei (.prot-file) zusammengefasst und mit Hilfe eines Fortran-Skripts (Dr. Oliver Ohlenschläger, Fritz-Lipmann-Institut, Jena) in eine ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -HSQC-Signalliste umgeschrieben, so dass man diese dann als Ausgangspunkt für die Zuordnung im HCCH-TOCSY benutzen kann, so wie dies vorher mit den Rückgrat-Experimenten und dem ${}^1\text{H}, {}^{15}\text{N}$ -HSQC der Fall war. Als Ausgangslage hat man dann also die $^{13}\text{C}_\alpha/{}^1\text{H}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta/{}^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen als Diagonalsignale vorliegen, und kann nun die Kreuzsignale den entsprechenden Protonen- und Kohlenstoff-Verschiebungen der jeweiligen Aminosäure zuordnen. Die meisten Aminosäuren haben ein immer sehr ähnliches Bild ihrer Signale, so dass man die meisten eindeutig zuweisen kann. Unter http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm ist in tabellarischer Form für jedes Atom jeder Aminosäure seine chemische Verschiebung als Minimal-, Maximal-, und Durchschnittswert mit Standardabweichung unter Nennung der Häufigkeit der an die BMRB-Datenbank berichteten Proteine zu finden. Diese Werte, die stets aktualisiert werden, dienen als wichtige Orientierungshilfe beim Zuordnen der einzelnen Kreuzsignale in einem „Streifen“ einer Aminosäure. Hat man aus den aus der ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -HSQC-Signalliste bekannten Diagonalsignalen möglichst viele Signale ihren Protonen in der entsprechenden Aminosäure zugeordnet, gilt es als nächstes den an diese neu gefundenen Protonen gebundenen Kohlenstoffe (z. B. in Methylgruppen) die chemischen Verschiebungswerte zuzuweisen. Hierzu muss man im Spektrum einen „Streifen“ der aus der generierten ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -HSQC-Signalliste bekannt ist im Spektrum „wieder finden“. Aus der Tabelle kann man ppm-Werte entnehmen, bei denen der gesuchte „Streifen“ zu finden sein sollte, so dass man normalerweise nur wenige ppm im Spektrum abfahren muss um den entsprechenden „Streifen“ zu finden.

Die Zuordnung der aromatischen Seitenketten von Tyrosinen und Phenylalaninen wurde in einem ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -NOESY durchgeführt, das in D_2O aufgenommen wurde, so dass die Amid-Protonen die Signale der aromatischen Seitenketten nicht überlagern. Auf diese Weise konnte ein beträchtlicher Teil

der Seitenketten zugeordnet werden: H^N (93%), C_α (95%), H_α (94%), C_β (96%), H_β (91%), C_γ (44%), H_γ (69%), C_δ (24%), H_δ (72%) und C' (85%).

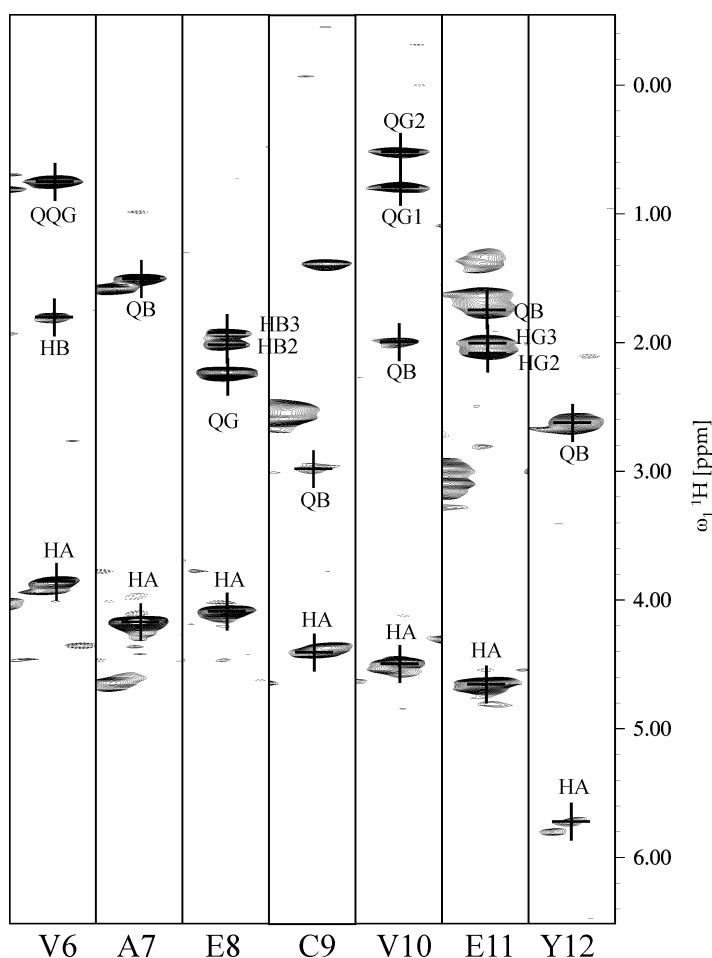


Abbildung 3.9: Die $[\omega_1(^1H), \omega_3(^1H)]$ „Streifen“ wurden für die H_α -Diagonalsignale der Aminosäuren V6-Y12 aus dem HCCH-TOCSY Spektrum extrahiert. Für zusammenfallende Resonanzen wurden Pseudoatome eingesetzt (3 x H bei der Methylgruppe in A7 werden zu QB). Bei V6 geben die beiden Methylgruppen im Gegensatz zu V10 nur ein Signal, was zur Bezeichnung QQG führt.

3.3.2. Sekundärstruktur-Vorhersage in Parvulostat

Die chemischen Verschiebungen von H_α , C_α , C_β , C' , H^N und N sind mit der Sekundärstruktur der Aminosäuren stark korreliert. [129] Eine Methode um diese Korrelation zu untersuchen ist PSSI (Probability based Secondary Structure Identification) [130]: hierbei werden die genannten chemischen Verschiebungen aus Parvulostat mit den „random coil“- α -Helix-, und β -

Faltblatt-Werten verglichen, womit dann entsprechende Sekundärstrukturelemente identifiziert werden können. Die Verlässlichkeit der Vorhersagen ist unter den 20 Aminosäuren sehr unterschiedlich, aber auf den Unterschied zwischen „random coil“ und β -Faltblättern bezogen, kann man sagen, dass die Ordnung $H_\alpha > C_\beta > H^N \sim C_\alpha \sim C' \sim N$ zutrifft. Die gemeinsame Darstellung dieser Werte ist in Abbildung 3.10 zu sehen, wobei deutlich zu sehen ist, dass 6 separate Regionen ins Negative ausschlagen, was auf eine β -Faltblattstruktur hinweist. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit der berechneten Struktur von Parvulostat, die, ähnlich dem Tendamistat, aus zwei gegenläufigen Faltblättern besteht. Interessanterweise werden auch die später als Kurvenregion definierten Aminosäuren von 39-41 im negativen Bereich angezeigt.

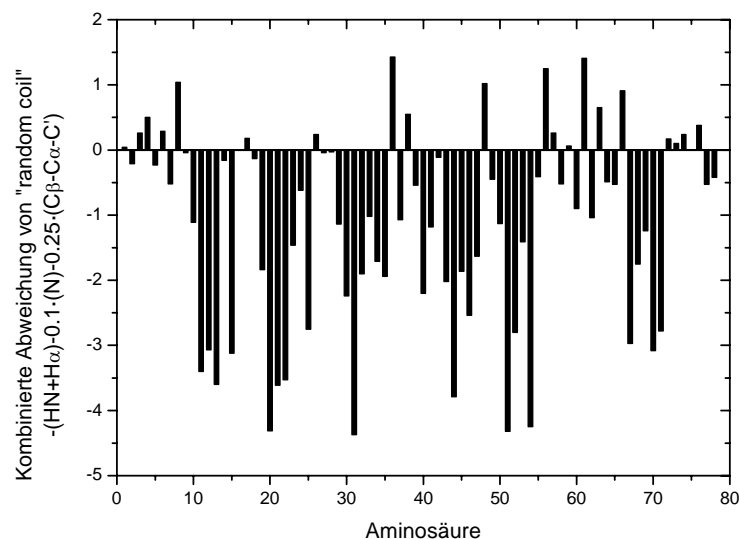


Abbildung 3.10: Darstellung der kombinierten Abweichung der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats von den „random coil“-Werten. Negative Werte deuten auf eine β -Faltblattstruktur hin (10-15, 18-25, 29-35, 39-47, 49-55, 66-70).

Um weitere Korrelationen für die Sekundärstruktur des Proteins zu erhalten wurden H/D-Austausch-Experimente vorgenommen. Hierfür wurde eine Probe, die unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben hergestellt wurde, gefriergetrocknet. Direkt vor den Messungen, die unter den gleichen Bedingungen wie alle anderen Experimente aufgenommen wurden (außer der Temperatur, die hier bei 41.5 °C lag), wurde mit der entsprechenden Menge an

D₂O wieder aufgefüllt, in das NMR-Röhrchen gefüllt und eine Reihe von SOFAST-HMQC's [116] aufgenommen. Das besondere daran ist, dass mit diesem Experiment innerhalb von ~2 min. Amid-Signale erzeugt werden können, was hierbei sehr wichtig ist, da man aufgrund der relativ hohen Temperatur bereits vermuten konnte, dass die Amid-Signale schnell verschwinden würden. Diese Vermutung wurde, wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, bestätigt und bereits 5 min nach dem Lösen des Proteins in D₂O sind bereits 40 der eigentlich 67 zu sehenden Amid-Signale verschwunden. Nach weiteren 24 min sind nur noch 14 Signale zu sehen und nach insgesamt 150 min nur noch 7 Signale.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
	ATGSPVAECV	EYFQSWRYTD	VHNGCADAVS	VTVEYTHGQW	APCRVIEPGG	WATFAGYGTG	GNVVTGLHTC	DPATPSGV	
Kline (TM, NMR, 2AIT):	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pflugrath (TM, X-ray, 1HOE):	—	—	—	—	—	—	—	—	
Wiegand (TM, X-ray, 1BVN):	—	—	—	—	—	—	—	—	
PROCHECK (TM, 2AIT):	—	—	—	—	—	—	—	—	
PROCHECK (TM, 1BVN, 1HOE):	—	—	—	—	—	—	—	—	
PROCHECK (Parvulostat):	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 5 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 8 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 14 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 17 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 20 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 29 min.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 1 hr.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 1,5 hrs.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 2 hrs.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 2,5 hrs.:	—	—	—	—	—	—	—	—	
Exp.(H/D) 18 hrs.:	—	—	—	—	—	—	—	—	

Abbildung 3.11: Vergleich der β -Faltblätter in Tendamistat und Parvulostat in der Literatur und Procheck [127; 128] mit den an Parvulostat durchgeführten H/D-Austausch-Experimenten. Nach 150 min sind nur noch die Amid-Resonanzen der Aminosäuren 11, 25, 29, 31, 32, 46 und 52 sichtbar, nach 18 Stunden nur noch die von 11, 25, 29 und 46.

Betrachtet man nun die Lage der einzelnen länger vorhandenen Amid-Signale, ist klar zu sehen, dass diese sehr gut der Lage der β -Faltblätter sowohl in Tendamistat als auch in den später für Parvulostat durchgeführten Rechnungen entsprechen. Es gibt jedoch drei Ausnahmen: die Aminosäuren 24, 25 und 50, die im unteren Teil des Proteins lokalisiert sind, was auf eine hohe Stabilität dieses Teils von Parvulostat schließen lässt. Weiterhin ist zu bemerken, dass im 6. β -Strang die Amid-Protonen offenbar sehr schnell gegen Deuterium autauschen, was auf nur schwach stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen in diesem Teil des Proteins schließen lässt.

3.3.3. Die NOESY-Zuordnung in Parvulostat

Um Informationen über die Distanzen zwischen einzelnen Atomen oder auch Atomgruppen (z.B. Methylgruppen) in Parvulostat herauszufinden, wurden verschiedene NMR-Experimente gemacht, deren Analysen sich zwar teilweise überlagern, insgesamt jedoch ein sehr dicht vernetztes Bild von Parvulostat ergeben. Das Vorgehen bei diesen Experimenten wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Zunächst wurden die beiden 3D-NOESY-HSQC-Spektren aufgenommen und analysiert, einmal ^{15}N - und einmal ^{13}C -editiert. Für das ^{15}N -NOESY-HSQC werden ähnlich wie für die Proteinrückgrat-Experimente die $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Signale als Grundlage (Diagonal-Signale) genutzt. Auch hier wird das Spektrum wieder aufgrund der Dispersion der Amid-Signale in „Streifen“ aufgeteilt, in denen hier allerdings dann die verschiedenen NOE-Signale zu finden sind. Zunächst kann man aufgrund der Daten, die man bei der Resonanzzuordnung gewonnen hat, diejenigen Signale identifizieren, die zur „eigenen“ Aminosäure eines bestimmten Amid-Signals gehören. Z. B. ist das „eigene“ H_α oft in einem entsprechenden geringen Abstand des Amid-Signals, dass man ein Signal an der entsprechenden Position findet. Als nächstes wurden die Amid-Amid-NOE-Signale zugeordnet. Hierbei werden zuerst die nächsten Nachbarn des Amid-Signals in Betracht gezogen und die Signalform der NOE-Signale in 1D-„Scheiben“ miteinander verglichen. Danach werden auch (sequentiell) weiter entfernte Signale mit dem Amid-Diagonal-Signal verglichen, um zu möglichst vielen Kreuz-Signalen ein Diagonal-Signal zu finden. Normalerweise sind immer zwei Paare von Diagonal- und Kreuz-Signal zu erwarten, da sich die entsprechenden Atom ja gegenseitig „sehen“ sollten, manchmal ist dies aber z. B. aufgrund von Überlagerungen nicht der Fall. Auf diese Weise wurden nach und nach die meisten Signale des Spektrums einem Atom des Proteins zugewiesen. Alle Signale wurden in XEASY [97] manuell ausgelesen und überprüft. In Abbildung 3.13 ist ein Ausschnitt aus dem ^{15}N -NOESY-HSQC zu sehen; deutlich zu erkennen sind die interresidualen NOEs der Amid-Protonen (Schrägstriche) zu ihren jeweiligen direkten Nachbarn $i+1$ und $i-1$ (waagrechte Linien). Die intraresidualen Signale sind jeweils mit Kreuzen dargestellt, während die unmarkierten Signale NOE's zu anderen, z. T. sequentiell weiter entfernten Aminosäuren darstellen.

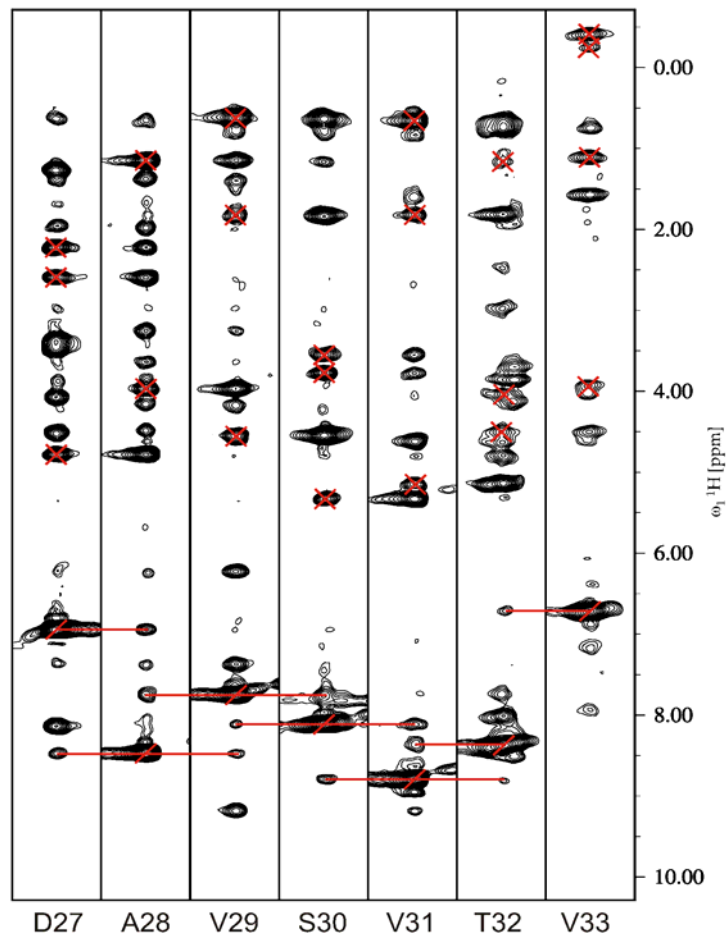


Abbildung 3.12: „Streifen“ aus dem ^{15}N -NOESY-HSQC der Aminosäuren 27-33 aus Parvulostat mit den jeweiligen Amid-Signalen als Diagonalsignal (Schrägstrich), ihren interresidualen Verbindungen zur Aminosäure $i+1$ und $i-1$ (Querstriche) sowie ihren intraresidualen Signalen (Kreuze).

Das ^{13}C -NOESY-HSQC wurde ähnlich bearbeitet, allerdings mit dem Unterschied, dass hier Diagonal-Signale z. T. erst noch gesucht werden mussten: begonnen wurde zunächst analog zum HCCH-TOCSY mit einer $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-Signalliste, in der allerdings nicht nur die $^{13}\text{C}_\alpha/^1\text{H}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta/^1\text{H}_\beta$ -Resonanzen sondern alle im HCCH-TOCSY gefundenen $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Paare als Diagonalsignale vorliegen. Dann wurden, wie im ^{15}N -NOESY-HSQC, nach und nach alle Signale zugeordnet, beginnend mit den gut aufgelösten (z. B. Methylgruppen). Weiterhin wurden hierbei auch neue Signale gefunden und eindeutig zugewiesen, z. B. Seitenketten-Signale von Prolinen, die etwa aufgrund des fehlenden Amid-Protons im Prolin bisher nicht zugeordnet werden konnten.

Im Anschluss an die Analyse dieser beiden Spektren wurden die drei 2D NOESYs analysiert, die bei verschiedenen Mischzeiten aufgenommen wurden sowie das 2D NOESY in 100 % D₂O. Zunächst wurde das Spektrum mit der längsten Mischzeit (150 ms) analysiert, indem in den Signallisten der beiden zuvor untersuchten 3D-Spektren die Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Zuordnungen entfernt wurden und beide Listen zu einer 2D-Signalliste zusammengesetzt wurden. Somit war es möglich das komplette 2D-Spektrum abzudecken und von da ausgehend neue Signalzuordnungen zu machen. In Abbildung 3.13 ist das ¹H-¹H-NOESY mit einer Mischzeit von 150 ms dargestellt, deutlich zu erkennen ist die Diagonale, sowie das Wassersignal bei ~4,5 ppm.

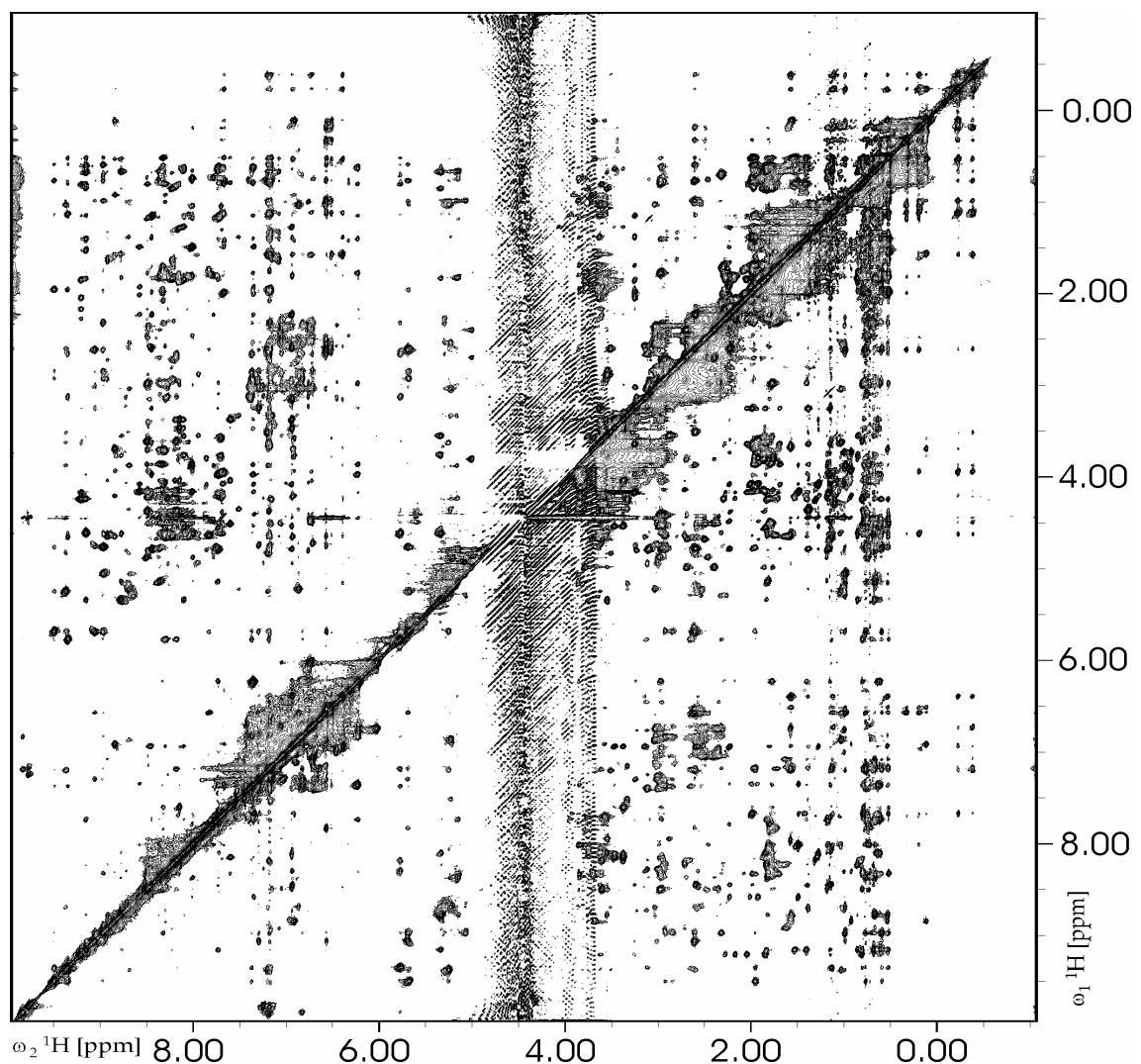


Abbildung 3.13: ¹H-¹H-NOESY in H₂O/D₂O : 9/1 mit einer Mischzeit von 150 ms.

Um die Überlagerungen die in Abbildung 3.13 zu erkennen sind zu entzerren, wurde ein NOESY-Spektrum in reinem D₂O aufgenommen, in welchem die Amid-Protonen mit Deuterium ausgetauscht wurden, und somit nicht mehr sichtbar waren. Dies führte maßgeblich dazu, dass die Protonen der aromatischen Seitenketten der Aminosäuren besser zu erkennen (siehe Abbildung 3.14) und zuzuordnen waren. Ein anderer Vorteil dieses Spektrums ist, dass durch den sehr geringen Gehalt an H₂O in der Probe, die Signale, die nahe am Signal von H₂O liegen und in Abbildung 3.13 noch überlagert sind, nun zugeordnet werden können.

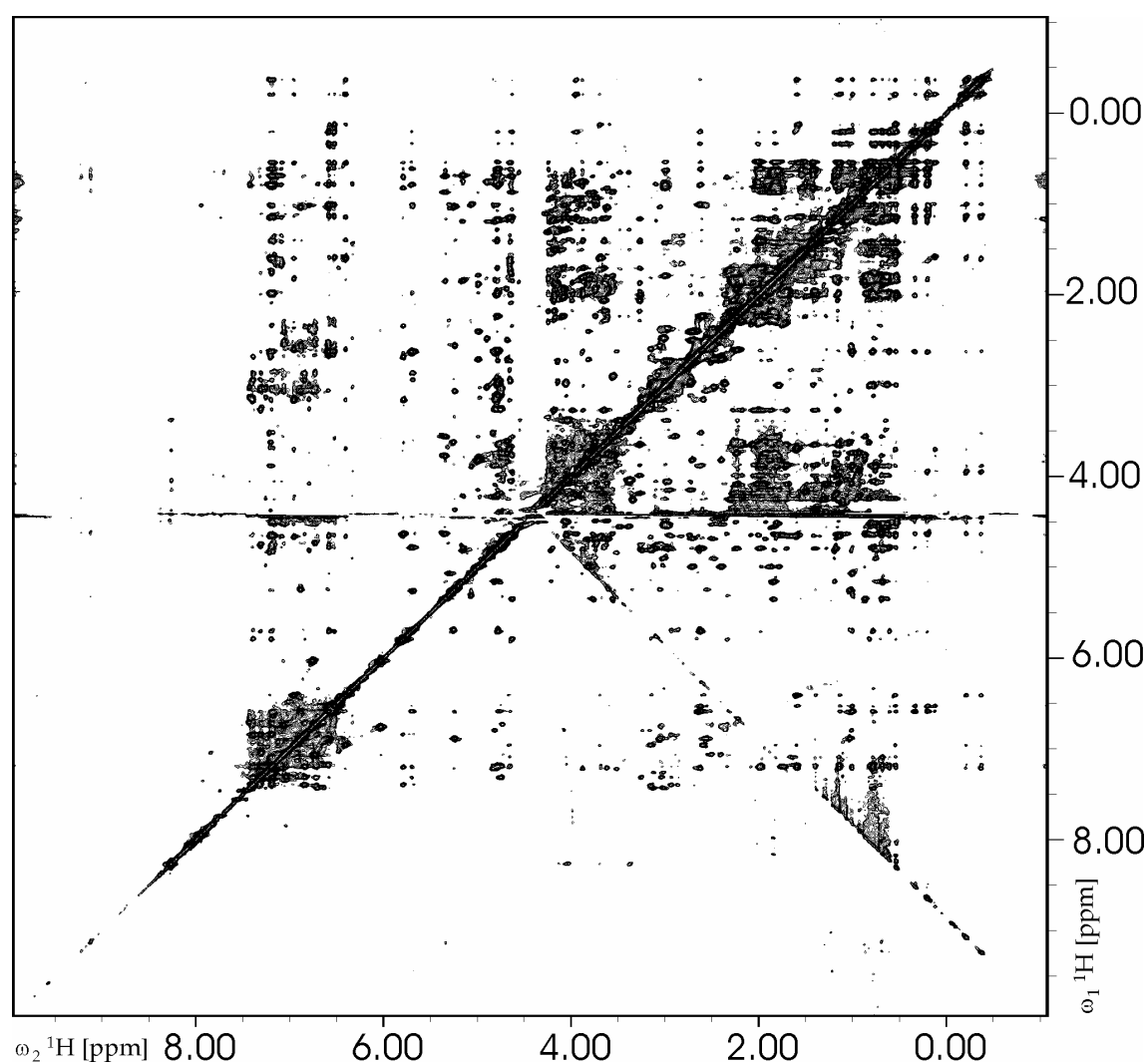


Abbildung 3.14: ¹H-¹H-NOESY in 100% D₂O mit einer Mischzeit von 325 ms.

Nach diesem Teil der Analyse wurden die NOEs des Proteinrückgrats genauer betrachtet, um nach den H/D-Austausch-Experimenten eine weitere Aussage bezüglich der Sekundärstruktur von Parvulostat machen zu können. Dies wird

durch für bestimmte Sekundärstruktur-Elemente charakteristische NOEs möglich: in β -Faltblättern findet man normalerweise starke sequentielle NOEs zwischen $H^N(i)$ und $H_\alpha(i-1)$, sowie zwischen $H_\alpha - H^N$ und $H_\alpha - H_\alpha$, die sich im β -Faltblatt gegenüber stehen. Gerade diese sich gegenüberstehenden NOEs sind sehr wertvoll für die Sekundärstruktur-Analyse, wie in Abbildung 3.16 zu sehen ist: hier wurden diese gegenüberstehenden NOEs in eine Kontaktkarte eingefügt, und man kann gut erkennen, dass sich daraus eine β -Faltblattstruktur mit jeweils 3 antiparallelen Strängen ergibt.

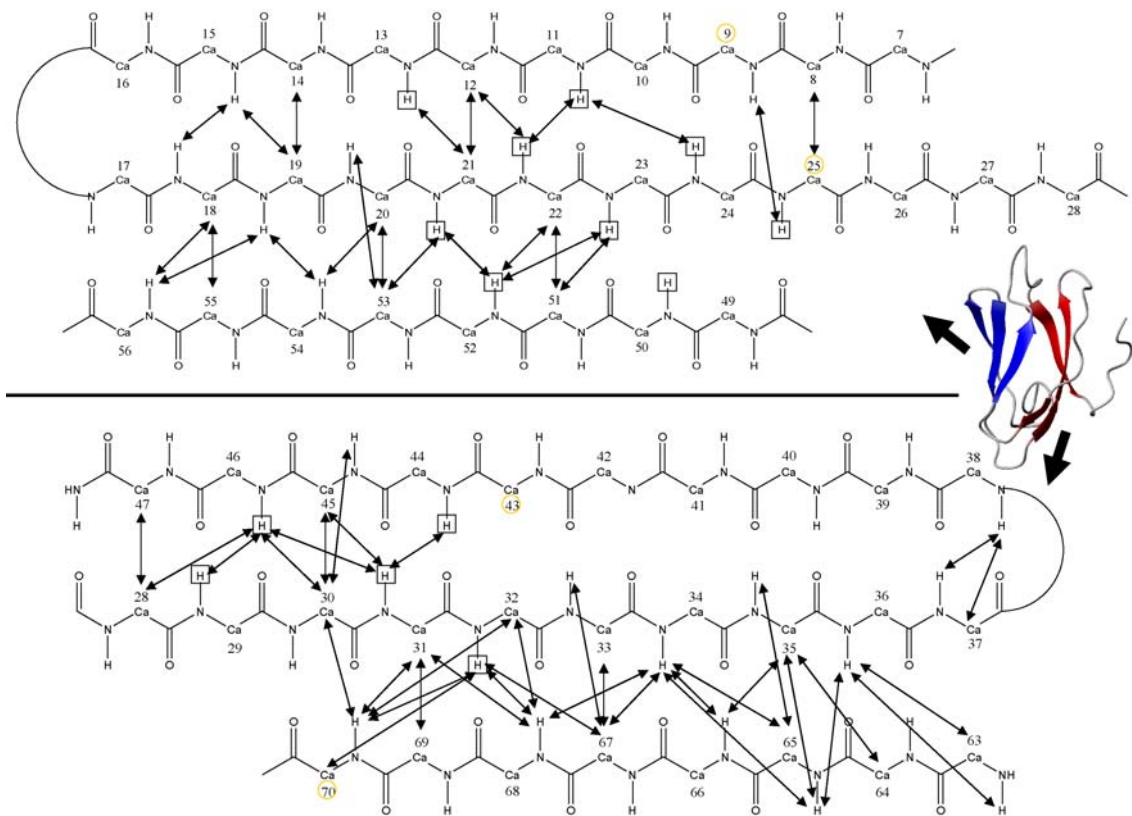


Abbildung 3.15: NOE-Kontaktkarte der zwei β -Faltblätter von Parvulostat; oberer Teil: β -Stränge 1,2 und 5 (inklusive des aktiven Zentrums); unterer Teil: β -Stränge 3,4 und 6; gelbe Kreise indizieren die 4 Cysteine. Die Amid-Protonen in Boxen sind die 14, die nach 29 min. im H/D-Austausch-Experiment noch zu sehen sind.

Dies deckt sich mit den Beobachtungen, wie sie bereits durch die Analyse der chemischen Verschiebungen des Proteinrückgrats und der H/D-Austausch-Experimente gemacht wurden in denen die Daten auf 6 β -Stränge hinweisen. Weiterhin bestätigt wird diese These dadurch, dass alle der in den H/D-Austausch-Experimenten nach 29 min noch vorhandenen Protonen im Inneren

der nun postulierten β -Faltblattstruktur liegen und so, wie auch durch vorhandene Wasserstoffbrückenbindungen, vor dem Austausch mit H_2O , der besonders schnell an der dem Lösungsmittel direkt exponierten Oberfläche des Proteins stattfindet, geschützt sind.

3.3.4. Skalare Kopplungen in Parvulostat

Wie in Kapitel 3.2.3.4. beschrieben wurde, um weitere Parameter für die Strukturrechnung zu erhalten, ein 3D HNHA-Experiment [114; 115] aufgenommen, um Informationen über die Bedingungen der ϕ Winkel in Parvulostat zu erhalten. Bei diesem Experiment wurden insgesamt 59 HNHA-Kopplungskonstanten aus den Verhältnissen der jeweiligen Kreuz- bzw. Diagonal-Signalintensitäten bestimmt. Wegen schnellem Protonenaustausch, Signalüberlappungen, sehr schwachen oder gar nicht vorhandenen Signalen konnten die Kopplungskonstanten für die Aminosäuren 1, 3, 14, 15, 16, 17, 37, 41, 55, 58, 59, 62, 63, 64, sowie für die 5 Proline (5, 42, 48, 72 und 75) nicht bestimmt werden. Die ϕ Winkel wurden mit Hilfe der Karplus-Gleichung aus den gemessenen Kopplungskonstanten vorausgesagt:

$$J(\phi) = A \cos^2 (\phi - 60) + B \cos (\phi - 60) + C$$

Diese J-Werte sind in Abbildung 3.16 zu sehen. Erwähnenswert ist, dass für die acht sichtbaren von insgesamt 10 Glycinen meist zwei Werte aufgrund von zwei Signalen im Spektrum (zwei α -Protonen mit zwei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen) existieren. Da für Glycine daher nicht klar ist, welches α -Proton das richtige ist, wurden diese als Parameter für die Strukturrechnung außen vor gelassen und somit nur 51 Werte benutzt. In Abbildung 3.16 ist jedoch der jeweils höhere Wert der Glycine mit berücksichtigt.

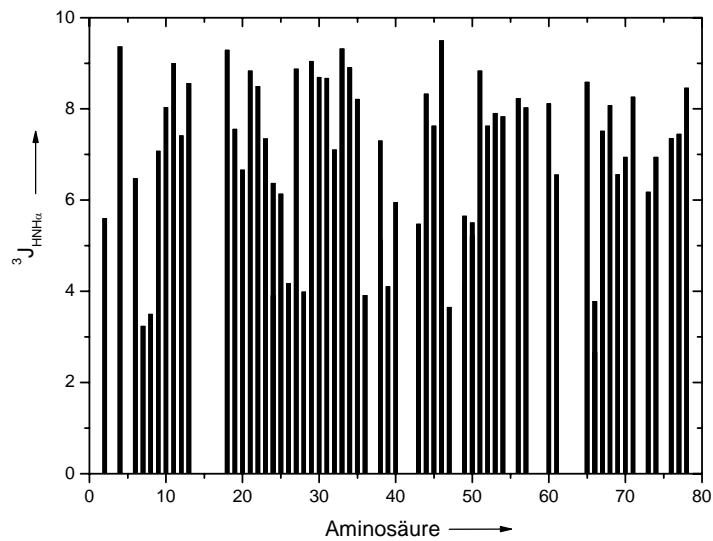


Abbildung 3.16: $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungen von Parvulostat: es wurden die Kopplungen von 59 Aminosäuren bestimmt. Für Glycine ist im Diagramm bei zwei Werten immer der höhere angegeben.

3.3.5. Die Rückgratdynamik in Parvulostat

Neben den in die Strukturrechnungen einfließenden Daten aus den NOESY-Experimenten und den skalaren Kopplungen wurde die Dynamik des Rückgrats durch die Messungen verschiedener Relaxationsparameter bestimmt, welche später ebenfalls für die Berechnungen benutzt wurden. Hierfür wurden $^{15}\text{N-T}_1$, $^{15}\text{N-T}_2$, sowie $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -hetNOE, alle bei 600 MHz und 45 °C gemessen und mit Sparky [98] analysiert.

Für die Werte der hetNOE-Messungen gilt, dass die Werte am C-Terminus von Parvulostat sehr klein und sogar negativ sind (siehe Abbildung 3.17), was hier bereits auf ein flexibles Ende des Proteins schließen lässt.

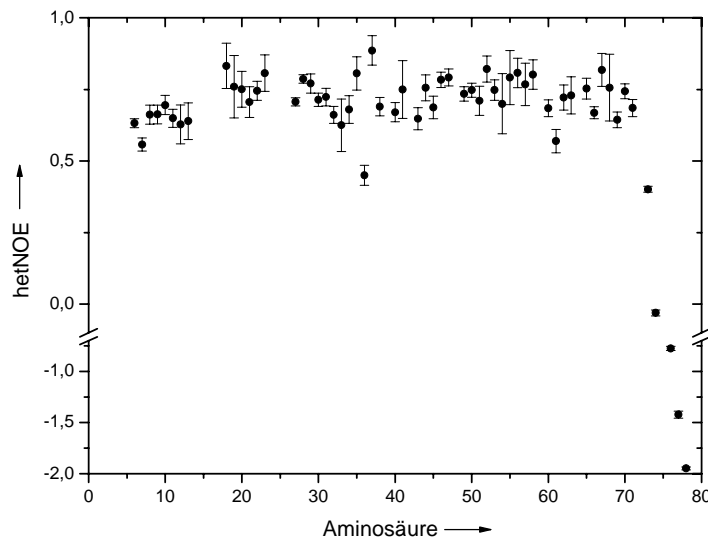


Abbildung 3.17: $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -hetNOE von Parvulustat, gemessen bei 600 MHz und 45 °C.

Für das R_2/R_1 -Verhältnis der Relaxationsraten gilt (siehe Abbildung 3.18), dass viele Aminosäuren, besonders aus der mittleren Region, sich um einen Wert von 5 bewegen (mit einigen Ausreißern nach oben). Am C-Terminus hingegen bewegen sich die Werte hingegen um 2.

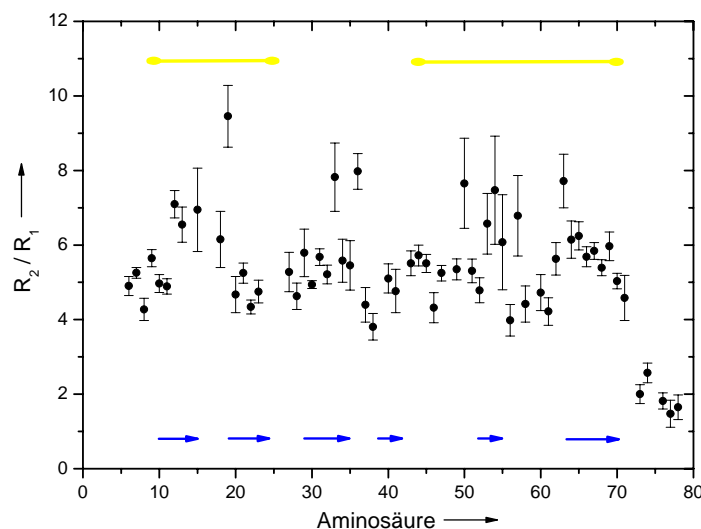


Abbildung 3.18: ^{15}N R_2/R_1 -Verhältnisse von Parvulustat, gemessen bei 600 MHz und 45 °C; blaue Pfeile zeigen die Positionen der β -Faltblattstränge an, die gelben Balken die Disulfidbrücken (9-25 und 43-70).

Aus diesen Werten wurde nun mit Hilfe von Model-free [121; 122] der Ordnungsparameter von Parvulostat berechnet. Der Ordnungsparameter eines globulären Proteins sollte sich knapp unter eins bewegen, kleinere Werte lassen auf Flexibilität schließen. Hier (siehe Abbildung 3.19) ist nun deutlich zu sehen, dass der C-Terminus recht kleine Werte aufweist und somit sehr wahrscheinlich sehr flexibel ist. Flexibilität kann man auch den beiden Schleifenregionen um die Aminosäuren 37 und 60 unterstellen, da auch hier kleinere Ordnungsparameterwerte zu finden sind. Daraus wiederum lässt vermuten, dass die dritte Schleifenregion des Proteins ebenso flexibel ist, obwohl hier die meisten Werte u. a. wegen zu breiter und daher nicht detektierbarer Signale fehlen. Gleiches gilt für den N-Terminus, der auch nicht detektierbar ist, allerdings kann man hier die etwas niedrigeren Werte der Aminosäuren 6-9 heranziehen, um zu vermuten, dass auch dieses Ende des Proteins flexibel ist.

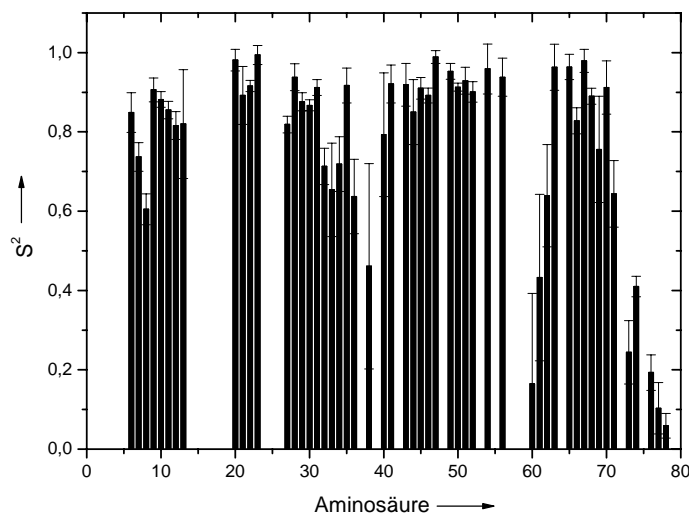


Abbildung 3.19: Ordnungsparameter von Parvulostat, analysiert mit Model-free [121; 122]; flexible Teile des Proteins sind in den Schleifenregionen um die Aminosäuren 37 und 60 zu erkennen, so dass man eine gewisse Flexibilität auch für die dritte Schleife um Aminosäure 16 annehmen kann, obwohl hier sowie auch an anderen Stellen entweder kein Wert vorliegt oder aber dieser nicht glaubwürdig war.

3.3.6. Berechnung der 3D-Struktur von Parvulostat

Nachdem nun alle unzweifelhaft zuzuordnenden Signale der NOESY-Spektren benannt worden sind, die Relaxationsdaten und die Kopplungskonstanten analysiert worden sind, wurde begonnen Berechnungen mit ARIA 1.2 [123], wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben, durchzuführen. Als Eingaben benutzt wurden für die Rechnungen neben den Daten aus den sechs NOESY-Spektren die Relaxationsdaten, die skalaren Kopplungen, definierte dihedrale Winkel, sowie definierte Wasserstoffbrückenbindungen. In den sogenannten „overview files“ wurden nach einer Rechnung von ARIA [123] Vorschläge für neue Resonanz-Zuordnungen gemacht, die dann jeweils manuell in XEASY [97] überprüft und entweder mit in die Liste aufgenommen wurden oder, bei Nichtübereinstimmung der Signale – was aufgrund der Fehlertoleranzen von ARIA [123] vor allem bei späteren Rechnungen durchaus vorkam – eben nicht. Genauso wurde mit den „violation lists“ von ARIA [123] umgegangen, also Signalen, die die berechnete Struktur so häufig verletzt haben, dass ARIA [123] sie als falsch einstuft. Auch diese werden manuell überprüft und je nachdem entweder einer anderen Resonanz zugeordnet, oder in der fraglichen Dimension gar keiner Resonanz zugewiesen. Somit wird ARIA[123] an dieser Stelle nur die Information gegeben wird, dass sich an dieser Stelle ein Signal befindet, das aber bis jetzt noch nicht eindeutig einer Resonanz zugeordnet werden konnte. In der darauf folgenden Rechnung wird dieses Signal dann von ARIA [123] genauso behandelt wie alle Signale, die einer Resonanz nicht eindeutig zugeordnet werden konnten: ARIA [123] bekommt die Möglichkeit, diese Signale einer bestimmten Resonanz zuzuordnen, was dann natürlich Auswirkungen auf die Struktur hat. Je mehr Rechnungen gemacht wurden und je besser die Struktur wurde, desto öfter kam es allerdings vor, dass die Vorschläge von ARIA [123] nicht mehr übernommen werden konnten, so dass bei den letzten Rechnungen die Bedingungen in ARIA [123] so geändert wurden, so dass ARIA [123] nicht mehr die Möglichkeit hatte selbst Signale, die noch nicht zugeordnet waren, zuzuordnen (Einstellung: allassiwi1 -> onlyassiwi1). Weiterhin wurden die Ergebnisse der Berechnungen mit dem Programm Procheck [127; 128] analysiert, in welchem u. a. die Proteinrückgrat-Dieederwinkel der berechneten Struktur dargestellt werden, was ebenfalls zur Aufklärung der 3D-Struktur des Proteins beiträgt, da diese soweit möglich in den erlaubten Regionen des Ramachandran-Plots liegen sollen. Für die letzte hier durchgeführte Rechnung lagen von einem Bündel der 20 energieärmsten

Strukturen (aus 200) von Parvulostat (Aminosäuren 8-71) 75.5 % der Aminosäuren in den meistbegünstigten Regionen des Ramachandran-Plots, 20.1 % in zusätzlich erlaubten Regionen, 3.1 % in großzügig erlaubten Regionen, sowie nur 1.3 % in nicht erlaubten Regionen, was sich zumindest teilweise mit der Flexibilität der Schleifen-Regionen im Protein erklären lässt. Ebenfalls von Procheck [127; 128] analysiert wurde die Standardabweichung vom Mittelwert (RMSD, root mean square deviation) für jede Aminosäure, deren Wert zunächst eine Aussage über die Richtigkeit der berechneten Struktur gibt: je kleiner der Wert für das gesamte Protein, desto weniger unterschiedlich sind die berechneten Strukturen voneinander und die Wahrscheinlichkeit, dass diese Struktur der Struktur des Proteins in Lösung sehr ähnlich ist, steigt damit. Der kleinste hier berechnete Wert für die Standardabweichung betrug für das Protein-Rückgrat 0.514 und für die Schweratome 0.912 (Aminosäuren 8-71). Weiterhin kann man aber auch die Standardabweichung der einzelnen Aminosäuren im Bündel betrachten: hier zeigt sich (siehe Abbildung 3.20) eine Übereinstimmung der höheren Werte der Standardabweichung mit den flexiblen Teilen des Proteins, vor allem die beiden Enden, aber auch die Schleifen-Regionen, besonders deutlich um Aminosäure 60, aber auch um die Aminosäuren 16, 26, 39 und 48.

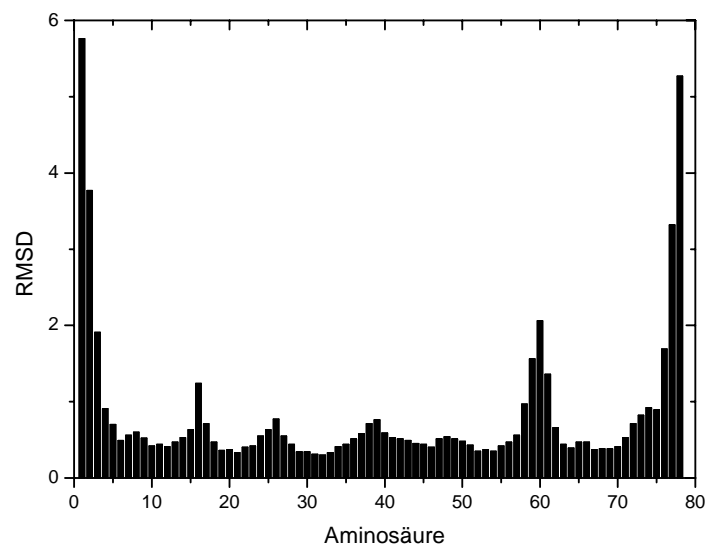


Abbildung 3.20: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Rückgrat-Standardabweichung (RMSD) für jede Aminosäure ausgehend vom Mittelwert. Die hier gezeigten Werte wurden aus dem Ensemble der 20 energieärmsten Strukturen berechnet.

Am Ende der Berechnungen mit ARIA, also wenn es nach vielen iterativen und jeweils manuell geänderten Rechnungen nicht mehr die Möglichkeit einer Verbesserung der Struktur gibt, werden die Ein- bzw. Ausgabewerte der finalen Rechnung, wie in Tabelle 3.3 zu sehen, dargestellt. Neben den experimentellen Werten werden energetische Werte, Standardabweichungen und besonders die prozentuale Verteilung der einzelnen Aminosäuren des Bündels mit den 20 energieärmsten Strukturen im Ramachandran-Diagramm angegeben. Bei diesem war das Ziel einen möglichst hohen Prozentsatz in den meistbegünstigten Regionen zu erreichen, bei möglichst kleinen Prozentsätzen in den anderen Regionen. Dies wurde während des Optimierungsprozesses für die Proteinstruktur durch die Rechnungen erreicht, indem nach einer Rechnung die Lage der einzelnen Aminosäuren in Procheck graphisch dargestellt werden konnte und somit energetisch ungünstige Lagen einzelner Aminosäuren erkannt werden konnten. An diesen Stellen erfolgte dann eine eingehende Überprüfung der NOE-Kontakte, um eventuell falsch zugeordnete Resonanzen zu erkennen und auszubessern.

Experimentelle Werte	
<i>Distanzwerte</i>	
Intraresidual (i-j = 0)	526
Sequentiell (i-j = 1)	361
Mittlere Reichweite ($2 \leq i-j \leq 4$)	111
Lange Reichweite ($ i-j \geq 5$)	723
Wasserstoffbrückenbindungen	19
Gesamt	1740
<i>Dihedrale Winkelbegrenzungen</i>	
Torsionswinkel (phi/psi)	2 x 32
<i>J-Kopplungskonstanten</i>	
$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungskonstanten	51
<i>Diffusions-Anisotropiewerte</i>	
T ₁ /T ₂ Werte für HN	54
CNS Energien (kcal/mol)	
E _{total}	-1704 ± 70
E _{vdw}	-123 ± 11
E _{elec}	-2498 ± 65
E _{noe}	129 ± 8
E _{phi/psi}	0 ± 0
E _{coupl}	46 ± 6
E _{dani(T1/T2)}	51 ± 5
RMSD gemittelt pro Aminosäure (Å)^[a]	
Rückgrat N, CA, C'	0.514
Schweratome	0.962
Ramachandran Diagramm^[a] (%)	
Meistbegünstigte Regionen	75.5
Zusätzlich erlaubte Regionen	20.1
Großzügig erlaubte Regionen	3.1
Nicht erlaubte Regionen	1.3

Tabelle 3.3: Statistik für das Ensemble von 20 NMR Strukturen; [a]: Die Werte wurden für die Aminosäuren 8-71 mit Molmol[131] und Procheck[127; 128] berechnet.

Es gibt verschiedene Betrachtungsweisen des Ergebnisses einer Strukturrechnung: entweder, wie in Abbildung 3.20 als Darstellung der Standardabweichung, woraus man bereits auf gewisse Strukturelemente schließen kann, wie z.B. flexible Aminosäuren in den Schleifen und am Ende des Proteins, oder aber mit Hilfe von Programmen wie z. B. Molmol [131] und Pymol [132] eine bildhafte Darstellung. Um hierbei ein möglichst übersichtliches Bild der 3D-Struktur des Bündels der 20 energieärmsten

Strukturen von Parvulostat zu erhalten, wurde die Darstellung des Protein-Rückgrats ohne Seitenketten in Bandform benutzt, wobei auftretende Sekundärstrukturelemente (hier: β -Faltblätter) als flache Pfeile (die in Richtung C-Terminus zeigen) dargestellt werden. Alle Werte der Standardabweichung für jede Aminosäure sind um die energieärmste Struktur angepasst worden (Molmol [131]), wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist. Für diese letzte Rechnung wurden insgesamt 1721 NOEs benutzt, davon 526 intraresiduale ($i-j = 0$), 361 sequentielle ($|i-j| = 1$), 111 mit mittlerer Reichweite ($2 \leq |i-j| \leq 4$), und 723 mit langer Reichweite ($|i-j| \geq 5$). Weiterhin wurden auch 19 Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert und als solche in der Rechnung definiert, sowie 51 $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungskonstanten. Das bedeutet im Durchschnitt wurden pro Aminosäure in Parvulostat 23 Werte erhalten, die in die Rechnungen mit eingegangen sind. Insgesamt kann man also sagen, dass die 3D-Struktur von Parvulostat aus zwei verdrehten β -Faltblättern besteht, die jeweils aus drei antiparallelen Strängen bestehen. Die Struktur kann daher als Mitglied der „greek-key“- β -Faltblatt-Proteine bezeichnet werden, wozu auch der andere α -Amylaseinhibitor Tendamistat zählt. [87; 133] Deutlich zu sehen sind hier die, wie in Abbildung 3.20 als Standardabweichung dargestellten, flexiblen Bereiche des Proteins an seinen beiden Enden, sowie in den drei bezifferten Schleifen.

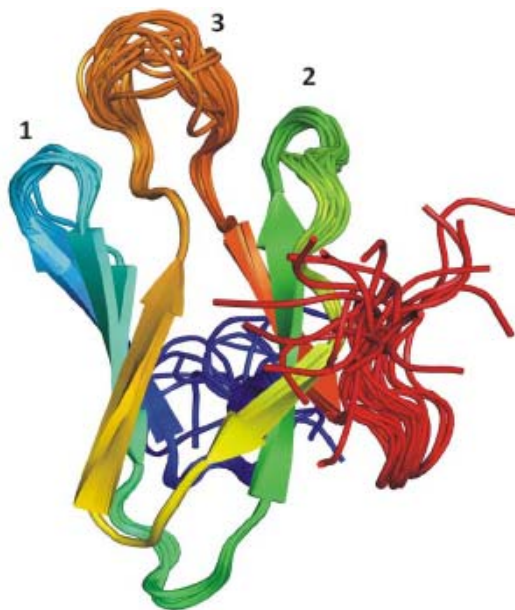


Abbildung 3.21: Darstellung des Rückgrats eines Strukturbündels (20) für Parvulostat (N-Terminus -> C-Terminus: blau -> rot; PDB ID Code: 2KER). Die Nummern bezeichnen die Schleifen sequentiell innerhalb des Proteins.

3.3.7. Diskussion der Struktur und Vergleich mit Tendamistat

Es ist nun von großem Interesse, die hier erhaltene Struktur genauer zu analysieren und sie mit der Struktur des anderen sehr gut untersuchten α -Amylaseinhibitor, Tendamistat (siehe Kapitel 3.1.2), zu vergleichen. Einen ersten Eindruck der hohen Ähnlichkeit beider Proteine kann man in Abbildung 3.22 sehen: das Strukturbündel von Parvulostat (blau) wurde hier mit dem Strukturbündel von Tendamistat (rot) überlagert. Diese große Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen erscheint zunächst logisch, da beide ungefähr die gleiche Größe haben (Parvulostat ist nur 4 Aminosäuren länger als Tendamistat, siehe Abbildung 3.2) und sie auch beide dieselbe Funktion haben, nämlich als α -Amylaseinhibitor zu agieren. Letzteres ist sogar mit vergleichbaren Bindungskonstanten der Fall (Tendamistat: 9×10^{-12} M [134]; Parvulostat: 2.8×10^{-11} M (Han *et al.* nicht publizierte Ergebnisse)).



Abbildung 3.22: Überlagerung des Parvulostat-Rückgrat-Strukturbündels (blau) mit dem Tendamistat-Rückgrat-Strukturbündel (PDB ID Code: 2AIT, rot, 9 Strukturen). [135]

Da es nur eine sehr qualitative Aussage ist, die überlagerten Strukturen zu betrachten, ist es sinnvoll einzelne Teile der Strukturen genauer zu analysieren. Wichtige Teile jeder Proteinstruktur sind die in ihr enthaltenen Sekundärstrukturelemente (hier: β -Faltblätter). In der NMR-Struktur von Tendamistat (2AIT) werden für die β -Faltblätter bildenden Teile folgende

Aminosäuren angegeben: 12 - 17, 20 - 25 und 52 - 58 im ersten Faltblatt und 30 - 37, 41 - 49 und 67 - 73 im zweiten Faltblatt. [87] Die hydrophoben Seiten der zwei β -Faltblätter sind einander zugewandt und formen dabei ein hydrophobes Herzstück („hydrophobic core“).

Im berechneten Strukturbündel von Parvulostat hingegen wurden folgende Teile durch Procheck den β -Faltblättern zugeordnet: 10 - 15, 18 - 23 und 53 - 54 im ersten Faltblatt und 29 - 35, 44 - 46 und 64 - 69 im zweiten Faltblatt. Wenn man nun die jeweilige Nummerierung der beiden Proteine (siehe Abbildung 3.2) berücksichtigt, sind die ersten beiden Stränge im ersten Faltblatt je eine Aminosäure länger, während das dritte Faltblatt (52 - 58 bzw. 53 - 54) in Parvulostat 5 Aminosäuren kürzer ist. In Tendamistat ist dieser dritte Strang deformiert, sowohl in der NMR- wie auch in der Röntgenkristallographie-Struktur, was eine Verdrehung in diesem β -Faltblatt induziert. In Parvulostat hingegen sind diese Stränge gerade, was sehr wahrscheinlich der Grund dafür ist, dass sie etwas kürzer sind.

Parvulostat formt aus denselben Gründen wie Tendamistat eine β -Faltblatt-Struktur: in Abbildung 3.23 ist deutlich zu erkennen, dass im Inneren des Proteins fast keine Ladungen auftreten (rot: negativ geladen, blau: positiv geladen) und alle nicht geladenen Seitenketten das hydrophobe Herzstück in Parvulostat erzeugen.

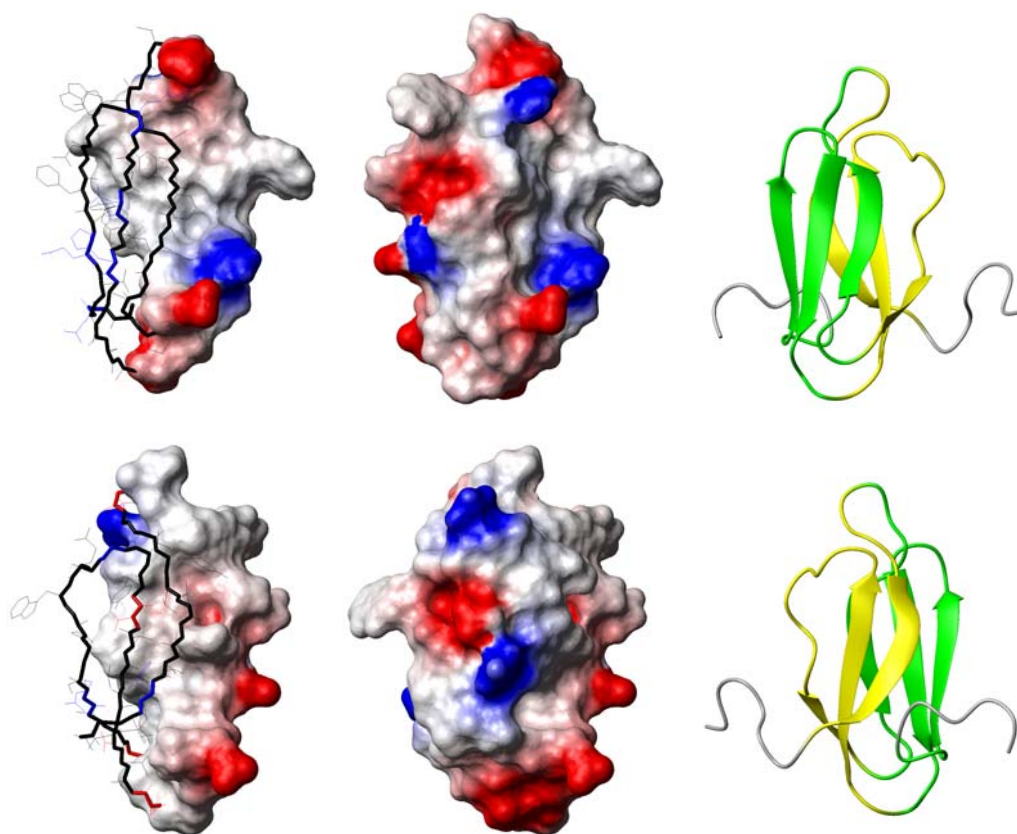


Abbildung 3.23: Links: das Innere von Parvulostat von beiden Seiten des Proteins gesehen mit farblicher Kodierung der Ladungen (rot: negativ geladen, blau: positiv geladen); Mitte: Ladungsverteilung des kompletten Proteins aus demselben Winkel wie links gezeigt; rechts: Rückgratbanddarstellung von Parvulostat, ebenfalls aus demselben Winkel, jeweils ein β -Faltblatt in gelb bzw. grün dargestellt (oben: Faltblatt 1 grün, Faltblatt 2 gelb, unten konträr dazu). [135]

Diese Eigenschaft von Parvulostat wird besonders deutlich, wenn man sich die NOEs der Seitenketten näher betrachtet, die in das Innere der Struktur gerichtet sind. Sehr gut erkennbar ist das in F54: die aromatische, hydrophobe Seitenkette dieses Phenylalanins sitzt genau in der Mitte des Proteins und ist durch 37 NOEs definiert. In Abbildung 3.24 sind diese NOEs zu sehen und alle weiteren, die von Aminosäuren in Parvulostat stammen und deren Seitenkette ins Innere des Proteins ragt. Interessanterweise besitzt die Seitenkette von V29 keine NOEs zu einer dieser Seitenketten. Als Gründe hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten: zum einen könnte diese Seitenkette flexibel sein, und somit im NMR-Spektrum keine NOE-Signale sichtbar sein, oder aber sie besitzt nur NOEs zu Rückgratatomem des Proteins (die in diese Darstellung nicht mit aufgenommen wurden). Bei genauerer Betrachtung der Struktur kann man erkennen, dass die Seitenkette von V29 nicht genau in die Mitte ragt – wie das

etwa bei F54 der Fall ist – sondern halb nach außen dreht, was auch ein Grund ist, wenig NOEs zu den anderen in der Mitte befindlichen Seitenketten zu haben.

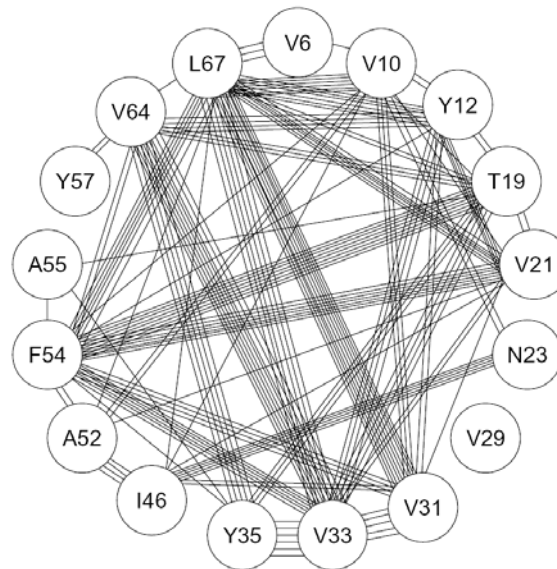


Abbildung 3.24: Präsentation der Seitenketten-Seitenketten-NOEs der Aminosäure-Seitenketten, die in das Innere des Proteins gerichtet sind.

Ein weitergehender Vergleich mit Tendamistat zeigt, dass es (siehe Abbildung 3.11) auch Unterschiede in der Darstellung der β -Faltblätter gibt: so sind die in der Literatur angegebenen Daten für an β -Faltblättern beteiligten Aminosäuren in Tendamistat sowohl für NMR als auch für Röntgenkristallographie (frei und komplexiert) sehr ähnlich, in einer Analyse mit Procheck jedoch scheint der vierte Strang wesentlich kürzer zu sein (nur 3 statt 9 Aminosäuren). Diese Beobachtung stimmt nun wieder mit sowohl den Procheck-Analysen als auch den H/D-Austausch-Experimenten für Parvulustat überein, in welchem der vierte Strang ebenfalls nur aus 3 Aminosäuren besteht.

Eben dieser vierte Strang des zweiten β -Faltblattes weist einen weiteren Unterschied der beiden α -Amylaseinhibitor-Strukturen auf: wie oben beschrieben ist der vierte Strang in Tendamistat (außer in der Procheck-Analyse) deutlich länger als in Parvulustat. Dies mag in Parvulustat die Ursache haben, dass sehr nahe neben den für das β -Faltblatt verantwortlichen Aminosäuren (44 - 46) ein Prolin sitzt (P42), während in Tendamistat an selbiger Stelle ein Leucin (L44) zu finden ist. Wegen seiner einzigartigen Konformation sind Veränderungen in diesem Strang und der darauf folgenden

Schleife im Vergleich zu Tendamistat abzusehen, was deutlich in Abbildung 3.25 zu sehen ist. Generell kann man in Bezug auf die β -Faltblattregionen sagen, dass die Strukturen von Tendamistat und Parvulostat sich hier sehr ähnlich sind, mit kleinen Unterschieden und etwas längeren β -Faltblättern in Tendamistat.

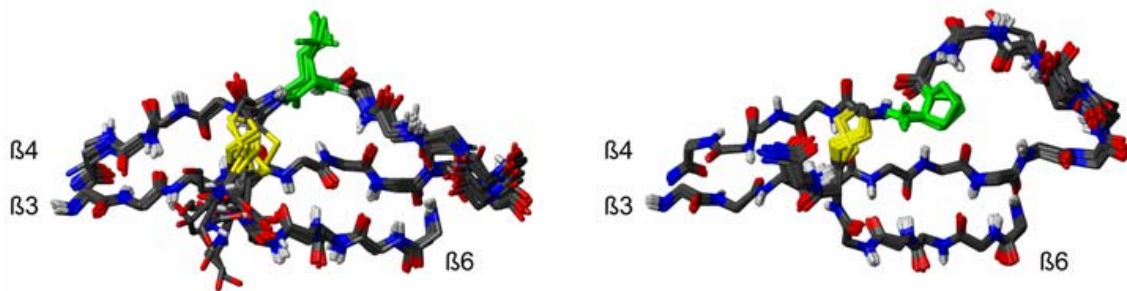


Abbildung 3.25: Blick auf das Protein-Rückgrat des zweiten β -Faltblatts von Tendamistat (links) und Parvulostat (rechts), sowie der hier vorhandenen Disulfidbrücke (gelb). Gekennzeichnet (grün) sind die in Parvulostat und Tendamistat zu strukturellen Unterschieden führenden Aminosäuren P42 (Parvulostat) und L44 (Tendamistat). [135]

Nachdem nun die recht stabilen β -Faltblattregionen betrachtet wurden, ist es weiter sehr interessant, die teilweise sehr flexiblen Schleifenregionen dieser beiden Proteine genauer zu analysieren, da diese auch eine wichtige Rolle in den Strukturen von Tendamistat und Parvulostat spielen. Ebenso bedeutungsvoll ist, dass der konservierte Sequenzteil WRY, der verantwortlich für die Bindung an α -Amylase ist, Teil einer solchen Schleife ist. In Parvulostat sind den Schleifenregionen folgende Aminosäuren zuzuordnen: 15 - 18, 23 - 28, 36 - 40, 47 - 50 und 55 - 63.

Die Schleifen von 36 - 40 und von 55 - 63 sind flexibel. Die Flexibilität dieser Regionen wird u. a. durch die Relaxationsdatenanalyse mit model-free [121; 122] bestätigt: der Ordnungsparameter (S^2 , siehe Abbildung 3.19) zeigt zwei flexible Schleifenregionen im Protein auf (um die Aminosäuren 37 und 60). Über die Schleifenregion in der die konservierte Bindungssequenz enthalten ist lässt sich nur spekulieren, da die NMR-Resonanzen zu stark verbreitert sind, als dass man sie mit NMR detektieren könnte. Dies wiederum lässt auf einen konformativen Austausch im Millisekunden-Bereich schließen und ist bemerkenswert, weil es entsprechend auf Dynamik im Millisekunden-Bereich schließen lässt und so die Möglichkeit eines Mechanismus mit induzierter Passform (induced-fit) bei der Bindung an α -Amylase eröffnet. Dass hier also

eine erhöhte Flexibilität vorliegt, wenn auch in einem anderen Zeitraum, wird weiter verstärkt durch die relativ hohen Werte für Y18 und T19 in ihrem ^{15}N R_2/R_1 -Verhältnis, wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist.

Die beiden anderen Schleifenregionen in Parvulostat (zwischen 23 - 28 bzw. 47 - 50) befinden auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins und sind sowohl im Rückgrat wie auch in den Seitenketten der Struktur sehr definiert. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit der Struktur von Tendamistat, in der diese Regionen auch sehr gut definiert sind.

Neben Eigenschaften in der Struktur von Parvulostat selbst ist es auch wichtig den Vergleich mit Tendamistat in Bezug auf die Bindung an α -Amylase zu analysieren. Die Bindungskonstanten beider Proteine befinden sich in der gleichen Größenordnung: für Tendamistat wurde 9×10^{-12} M angegeben [134], für Parvulostat 2.8×10^{-11} M (Han *et al.* nicht publizierte Ergebnisse). Die Tatsache, dass für diese beiden proteinösen α -Amylase-Inhibitoren eine nahezu identische Bindungskonstante gefunden wird ist sehr interessant, da sowohl die Aminosäuresequenz, wie auch Teile der Ladungsverteilung und zu einem gewissen Teil auch die Struktur, und hier besonders die Orientierung der Seitenketten, durchaus verschieden sind. Die freie Form von Tendamistat ähnelt sehr stark der an α -Amylase gebundenen Form, woraus man schließen kann, dass Parvulostat und α -Amylase strukturelle Veränderungen während des Bindungsprozesses unterlaufen müssen.

Tendamistat bindet an α -Amylase in einer erweiterten Furche, wobei die Interaktionen in vier Segmenten stattfinden: Segment I: Y15, W18-Y20; Segment II: L44, Y46; Segment III: Q52-T55; Segment IV: D58-G62. [86] In Abbildung 3.26 (A) sind diese vier Segmente auf der (freien) Struktur von Tendamistat gekennzeichnet (gelb). Übertragen auf die Sequenz von Parvulostat sind diese Segmente auf der Struktur von Parvulostat in Abbildung 3.26 (D) ebenfalls gekennzeichnet. Die größten Unterschiede wurden im Segment II beobachtet, in welchem sich mit P42 in Parvulostat, bzw. L44 in Tendamistat, und R44 in Parvulostat bzw. Y46 in Tendamistat substantiell unterschiedliche Aminosäuren an derselben Stelle befinden, woraus strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren resultieren. Interessanterweise sind hier auch deutliche Unterschiede in der Orientierung der Seitenketten in der konservierten Bindungssequenz WRY erkennbar. Allerdings muss dazu gesagt werden, dass die Struktur dieses Teils hauptsächlich auf dem in der Strukturrechnung angewandten Kraftfeld beruht, da keine NMR-Signale in dieser Region erhalten wurden.

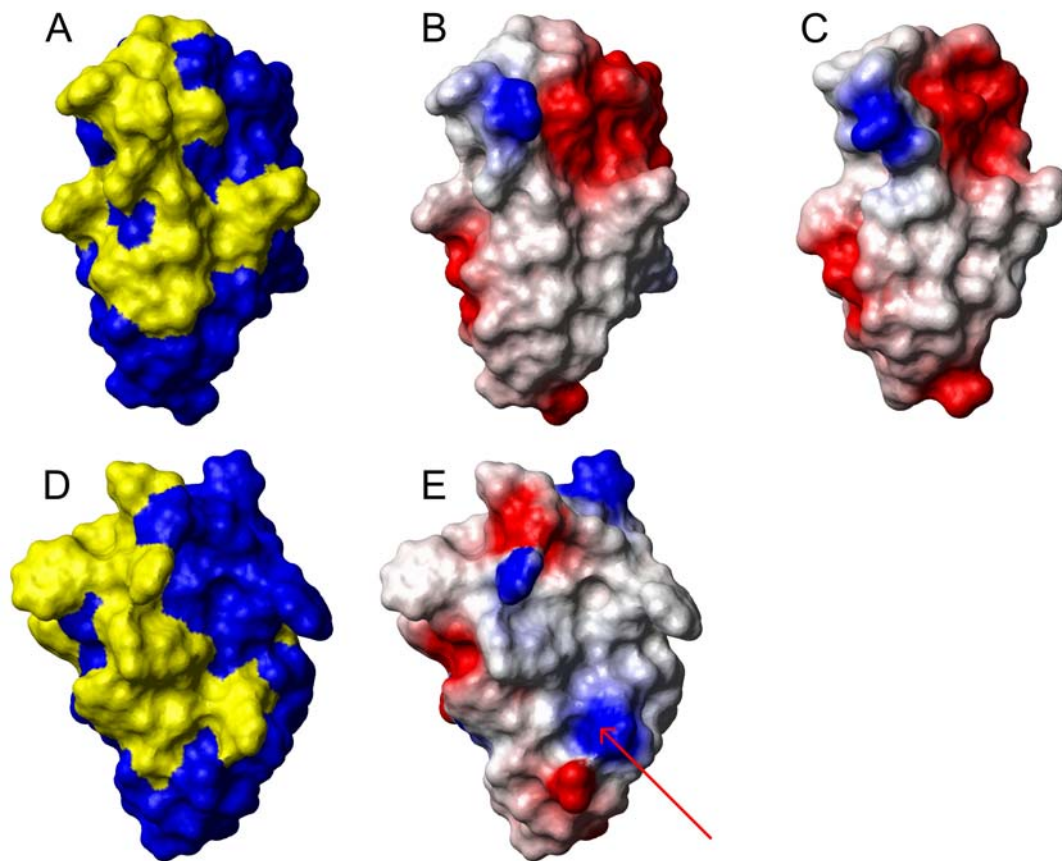


Abbildung 3.26: (A) Oberflächenpräsentation von Tendamistat (freie Form; gelb: Bindungssegmente zu α -Amylase); (B) Oberflächenpotential für die freie Form von Tendamistat (2AIT) und (C) die gebundene Form (1BVN), rot: negativ geladen, blau: positiv geladen; (D) Oberflächenpräsentation der Parvulustat-Struktur auf der die potentiellen Bindungssegmente von Tendamistat abgebildet sind (gelb); (E) Oberflächenpotential für Parvulustat, der rote Pfeil zeigt auf R44, was Y46 in Tendamistat entspricht. Die Oberflächenpotentiale wurden mit Molmol [131] berechnet. [135]

Die Ladungs- und Hydrophobie-Verteilungen in Abbildung 3.26 wurden mit Molmol [131] berechnet, basierend auf der Struktur mit der niedrigsten Energie aus dem oben gezeigten Strukturbündel. In Abbildung 3.26 ist die Ladungsverteilung auf der Oberfläche von Tendamistat (freie (B) und gebundene (C) Form) und Parvulustat (E) zu sehen. An einer Stelle jedoch ist ein relevanter Unterschied auszumachen: R44 in Parvulustat, bzw. Y46 in Tendamistat, also zwei sehr unterschiedliche Aminosäuren, führen zu einer veränderten Ladung an der Oberfläche von Parvulustat in dieser Region verglichen mit Tendamistat (siehe Abbildung 3.26: roter Pfeil). Alle weiteren für die Bindung an α -Amylase relevanten Aminosäuren sind zumindest von ihrer Ladungsverteilung in Tendamistat und Parvulustat relativ ähnlich. Auf der

Oberfläche der Proteinrückseite (nicht in Abbildung 3.26 zu sehen), die nicht in der Bindung an α -Amylase involviert ist, gibt es große Unterschiede, was den großen Unterschieden in ihren Sequenzen geschuldet ist.

In Abbildung 3.26 ist außerdem sehr gut erkennbar, dass Tendamistat in seiner freien Form (B) der an α -Amylase gebundenen Form (C) sehr ähnlich ist, woraus man schließen kann, dass sich die Struktur von Tendamistat während der Bindung an α -Amylase kaum ändert. [86; 87] Auch für die α -Amylase sind die Änderungen der Struktur klein. [136] Da Parvulostat zwar eine ähnliche Struktur wie Tendamistat hat, aber auch einige Unterschiede aufweist, kann man die These aufstellen, dass der Bindungsmechanismus von Parvulostat an α -Amylase ein Mechanismus mit induzierter Passform (induced-fit) oder sehr ähnlich dazu ist. Dies ist zu erwarten, da sich die Struktur von Parvulostat oder der α -Amylase, zumindest in den bindungsrelevanten Regionen, strukturellen Änderungen unterziehen muss, um einen ähnlich starken Komplex wie Tendamistat mit der α -Amylase zu bilden, was aufgrund ähnlicher Bindungskonstanten ja der Fall ist.

4. Zusammenfassung

4.1. Azopeptide

Peptide mit eingebauten lichtgesteuerten Schaltern sind interessante Systeme, um konformationelle Dynamik in Peptiden zu untersuchen. In dieser Arbeit ist es gelungen einen solchen Schalter herzustellen und in ein von Robertson *et al.* entworfenes Modellsystem als Teil des Peptidrückgrats einzuführen. Es wurde somit die Synthese von Peptiden mit eingebauten lichtgesteuerten Schaltern fortgeführt und auf ein größeres System übertragen. Die zu erwartenden Probleme bei der Synthese eines Systems dieser Größe (30 Aminosäuren + Schalter) konnten durch Modifizierung der Standardsynthese für Peptide (Fmoc-Strategie) an der Festphase erreicht werden. Es war daher möglich, ausreichende Mengen des Peptids herzustellen sowie die freie SH-Gruppe des Peptids mit einer Schutzgruppe zu versehen, was dem Molekül zu weiterer Stabilität verhalf.

Das Azopeptid wurde mit UV/vis- und Ultrakurzzeit-Spektroskopie, und besonders im Vergleich mit dem Schalter AMPB alleine, charakterisiert. Hierbei wurden folgende Erkenntnisse offen gelegt:

- Das Azopeptid in Wasser verhält sich bei Belichtung (367 nm) sehr ähnlich dem AMPB (7) in DMSO (isosbestischer Punkt bei 288 nm)
- Die thermische Rückreaktion lässt sich bei 330 nm biexponentiell fitten, bei 260 nm nicht, was Rückschlüsse auf mangelnde Stabilität des Azopeptids nach Belichtung zulässt (freie SH-Gruppe).
- Der Abfall des angeregten Zustandes des Azopeptids folgt multiexponentiellen Kinetiken auf Zeitskalen zwischen einigen hundert fs bis zu wenigen ps.
- Der Schalter AMPB (7) in DMSO verhält sich bei Belichtung (367 nm) sehr ähnlich dem beidseitig entschütztem Schalter (8) in Wasser.
- Es sehr ähnliche Kinetiken für AMPB (7) in DMSO und das Azopeptid in Wasser über den gesamten spektralen Bereich werden gefunden; Absorptionaufbau erfolgt innerhalb der Zeitauflösung des Experiments, Unterschied um einen Faktor 2 in der Zerfallsdynamik, die für das Azopeptid langsamer ist.

4.2. Parvulostat

Parvulostat ist wie Tendamistat ein α -Amylase-Inhibitor; die Struktur von Tendamistat ist bereits sehr gut sowohl durch NMR als auch durch Röntgenkristallographie untersucht ist. Mit Parvulostat teilt Tendamistat nur 29,6 % Sequenzidentität bei ähnlicher Länge und gleicher Funktion der beiden Proteine. Es war daher von großem Interesse, die Struktur von Parvulostat aufzuklären um Ähnlichkeiten und Unterschiede der beiden Proteine diskutieren zu können.

In dieser Arbeit ist es gelungen mit Hilfe der hochauflösenden, heteronuklearen 3D NMR-Spektroskopie in Lösung und iterativen Rechenmethoden die Struktur des Proteins Parvulostat, anhand von ^{15}N - und $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -markierten Proben, in sehr guter Qualität aufzuklären. Weiterhin ist es gelungen, dynamische Eigenschaften des Proteins durch Relaxationsdaten darzustellen.

Basierend auf diesen Daten war es möglich die beiden Proteine Parvulostat und Tendamistat umfassend miteinander zu vergleichen und Schlüsse bezüglich ihres Bindungsmechanismus zu ziehen.

Insgesamt ist zwischen beiden Proteinen eine große Ähnlichkeit zu verzeichnen, aber es wurden auch einige Unterschiede festgestellt: beide Proteine besitzen zwar die gleiche β -Faltblatt-Struktur, jedoch sind bei Parvulostat die einzelnen Stränge etwas kürzer ausgebildet. Weiterhin hat in Parvulostat ein Strang eine andere Krümmung, weil ein Prolin anstelle eines Leucins in Tendamistat sitzt und durch seine einzigartige Form die Struktur in dieser Region ändert. Bezug nehmend auf die Ladungsverteilung beider Proteine ist festzustellen, dass beide durch ein hydrophobes Herzstück stabilisiert werden und sich insgesamt sehr ähnlich sind, bis auf die Position R44 in Parvulostat bzw. Y46 in Tendamistat, was in Parvulostat eine positive Ladung an der Oberfläche generiert.

Generell ist noch zu sagen, dass man beim Interpretieren der Daten in Bezug auf Tendamistat vorsichtig sein muss, da es durchaus Unterschiede in der Datenakquise gibt: im Gegensatz zu Tendamistat dessen Struktur anhand von homonuklearen 2D NMR-Techniken aufgeklärt wurde, waren für Parvulostat bereits 3D Pulssequenzen verfügbar, NMR-Spektrometer mit höheren Feldern, weiterentwickelte Rechenprogramme, so dass u. a. auch die Relaxationsdaten einflussnehmend in die Strukturrechnung mit eingebaut werden konnten.

5. Appendix

Tabelle 5.1: Chemische Verschiebungen für Parvulostat gemessen bei 318 K ($^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}_{\alpha}$, $^{13}\text{C}_{\beta}$, $^{13}\text{C}'$, $^1\text{H}_{\alpha}$ und $^1\text{H}_{\beta}$).

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}^{\text{N}})$ [ppm]	$\delta(^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}')$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_{\alpha})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_{\alpha})$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_{\beta})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_{\beta})$ [ppm]
A1				4,015	49,800	1,381	17,640
T2	7,608	113,279	174,815		56,801		68,857
G3							
S4							
P5				4,493	61,290	1,814 2,237	30,190
V6	7,794	118,616	175,059	3,880	59,560	1,810	30,680
A7	8,029	126,653	173,395	4,167	50,780	1,503	18,292
E8	8,587	118,049	176,717	4,085	56,520	1,937 2,016	27,393
C9	7,348	109,798	173,399	4,422	51,850	2,993	38,617
V10	7,682	125,088	172,261	4,483	60,360	2,002	29,445
E11	8,322	124,099	172,004	4,644	51,852	2,002 2,079	31,925
Y12	7,843	115,283	172,281	5,697	53,160	2,617	40,610
F13	9,057	119,347	170,766	4,750	54,815		39,947
Q14				5,302	53,700	2,283	30,685
S15	8,657	119,667	172,296	4,715	54,708		64,456
W16							
R17				3,413	55,648	0,405	29,496
Y18	6,870	114,525	174,107	5,233	54,231	2,546 3,046	40,725
T19	8,684	119,368	173,054	5,061	60,704	3,876	67,997
D20	8,975	128,307	171,832	5,690	52,039	2,858 2,932	42,292
V21	9,496	123,356	173,611	4,775	59,478	1,967	32,243
H22	8,973	124,534	171,626	4,622	49,980	2,325	28,390
N23	8,317	123,095	171,836	4,517	49,380	1,781 2,986	36,018
G24	7,602	113,217	171,684	3,381 4,051	42,936		
C25	8,145	119,843	172,305	4,544	50,790	3,382 3,475	39,528
A26	8,111	119,852	172,481	4,084	50,950	1,278	17,251
D27	6,938	113,761	174,263	4,787	49,550	2,232 2,606	42,250
A28	8,454	121,635	173,188	3,986	50,550	1,159	16,820
V29	7,742	113,732	174,826	4,553	57,140	1,852	33,000
S30	8,101	118,729	171,613	5,338	54,310	3,556 3,768	62,237
V31	8,780	119,018	172,831	5,146	56,940	1,830	35,030

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}^{\text{N}})$ [ppm]	$\delta(^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}')$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_{\alpha})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_{\alpha})$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_{\beta})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_{\beta})$ [ppm]
T32	8,366	115,885	171,480	4,498	57,100	4,057	67,767
V33	6,720	119,716	169,808	3,950	57,990	1,132	32,331
E34	7,670	123,182	171,032	4,187	51,930	0,777 1,425	29,430
Y35	8,500	122,953	172,817	4,646	55,880	2,585 3,155	38,300
T36	8,295	119,739	175,873	3,731	65,169	4,069	67,700
H37	8,755	115,916	173,381	4,807	53,412	3,131 3,233	27,137
G38	7,856	106,387	174,479	3,795 4,091	43,935		
Q39	8,096	119,846	171,748	4,239	55,050	1,816	26,580
W40	8,286	121,182	172,966	4,961	55,210	3,012 3,122	28,161
A41	7,947	126,752	174,070	4,641	47,995	3,072	18,627
P42				4,240	60,853	1,721 2,307	30,203
C43	8,229	119,646	173,099	4,643	53,574	2,726 2,945	39,464
R44	8,931	128,546	172,821	4,653	51,850	1,646	30,892
V45	8,242	123,347	172,339	4,625	59,800	1,842	29,914
I46	9,161	128,086	174,656	4,241	58,660	1,414	37,551
E47	9,214	129,614	174,413	4,182	53,820	1,860 2,055	25,600
P48				3,872	62,770	1,702 1,960	29,241
G49	8,330	115,617	176,101	3,702 4,140	43,930		
G50	8,496	108,129	172,758	3,614 4,374	42,550		
W51	8,184	117,328	170,134	5,778	53,820	2,662 3,129	30,930
A52	9,354	122,785	174,350	4,654	49,250	1,142	20,971
T53	8,059	115,813	173,703	5,251	60,321	3,622	69,150
F54	9,370	125,684	171,593	4,827	53,813	2,617 3,517	40,556
A55	8,706	124,175	173,468	4,362	52,010	1,387	16,740
G56	7,517	110,256	178,583	3,339 4,252	42,282		
Y57	7,154	113,618	170,587	4,516	55,130	2,404 2,497	36,127
G58	8,498	109,549	175,193	3,420 3,946	43,806		
T59	8,301	111,031	172,318	4,277	60,637		67,412
D60	8,414	120,007	173,345	4,679	51,030	2,499 2,697	38,608
G61	7,967	108,692	175,339	2,879 3,550	44,956		
N62	8,507	120,625	172,217	4,455	48,627	2,358 2,971	34,339
Y63	6,994	116,333	172,042	4,477	56,210	2,366 3,041	36,755
V64	8,841	123,889	175,531	3,689	61,550	1,572	30,583
T65	8,850	119,739	175,388	4,210	60,109	3,931	66,710

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}^{\text{N}})$ [ppm]	$\delta(^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}')$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\alpha)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\alpha)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\beta)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\beta)$ [ppm]
G66	6,907	108,712	173,131	3,583 3,769	42,950		
L67	7,723	118,448	167,522	4,628	51,200	1,057 1,182	42,747
H68	8,003	116,650	174,161	4,890	52,180	3,000	31,877
T69	8,515	114,721	172,511	4,808	60,130	4,213	69,840
C70	7,731	117,575	172,053	4,786	51,950	2,980 3,098	43,320
D71	8,370	120,975	169,692	4,993	48,815	2,400 2,706	40,118
P72				4,145	61,360	1,891 1,974	30,141
A73	8,169	122,390	174,353	4,247	50,370	1,311	17,230
T74	7,704	114,834	175,770		57,794		67,994
P75				4,386	61,440	1,874 2,231	30,088
S76	8,209	115,319	175,051	4,373	56,360	3,782	61,939
G77	8,124	110,791	173,087	3,577 4,093	43,555		
V78	7,318	122,088	171,243	3,989	61,449	1,979	31,340

Tabelle 5.2: Chemische Verschiebungen für Parvulostat gemessen bei 318 K ($^1\text{H}_\gamma$, $^{13}\text{C}_\gamma$, $^1\text{H}_\delta$, $^{13}\text{C}_\delta$, $^1\text{H}_\epsilon$, $^1\text{H}_\zeta$, $^{15}\text{N}_\delta$ und $^{15}\text{N}_\zeta$).

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\epsilon)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\zeta)/$ $\delta(^{15}\text{N}_{\delta/\epsilon})$ [ppm]
A1						
T2						
G3						
S4						
P5	1,927	25,517	3,612	3,745	49,060	
V6	0,732 0,754	19,775				
A7						
E8	2,236	34,290				
C9						
V10	0,531 0,793	20,880 22,050				
E11	2,002 2,079	34,288				
Y12			6,572		6,515	
F13						
Q14						
S15						
W16						
R17						
Y18			6,572		6,514	
T19	0,999	19,499				
D20						
V21	0,603 0,779	20,267				
H22			7,193			
N23						
G24						
C25						
A26						
D27						
A28						
V29	0,624 0,652	16,330 18,250				
S30						
V31	0,679 0,682	18,381 20,243				
T32	1,155	19,440				

Tabelle 5.2 (Fortsetzung)

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\epsilon)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\zeta)/$ $\delta(^{15}\text{N}_{\delta/\epsilon})$ [ppm]
V33	-0,374 -0,216	17,230 20,094				
E34						
Y35			6,944		6,396	
T36	1,004	18,710				
H37			6,774			
G38						
Q39	2,178 2,293	31,802				
W40			7,247		7,411 7,176 9,791 128.933	
A41						
P42			3,666			
C43						
R44	1,346 1,407	24,943	2,811 2,916	40,528		
V45	0,690 0,866	18,755 19,280				
I46	0,621 0,815	16,330	0,536	13,700		
E47	2,177 2,279	33,683				
P48	1,395 1,992	26,171	3,264 3,646	48,241		
G49						
G50						
W51			7,183		7,369 6.829 9,856 129.871	
A52						
T53	1,036	20,839				
F54			7,168		7,204	
A55						
G56						
Y57			7,058		6,729	
G58						
T59						
D60						
G61						
N62			6,465 6,962			108.526
Y63						

Tabelle 5.2 (Fortsetzung)

Amino- säure	$\delta(^1\text{H}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\gamma)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^{13}\text{C}_\delta)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\epsilon)$ [ppm]	$\delta(^1\text{H}_\zeta)/$ $\delta(^{15}\text{N}_{\delta/\epsilon})$ [ppm]
V64	0,120 0,539	19,200 21,285				
T65	0,930	20,020				
G66						
L67			0,203 0,333	23,666 22,730		
H68			6,330			
T69	1,188	20,470				
C70						
D71						
P72	1,780 1,870	24,900	3,815	48,897		
A73						
T74						
P75	1,935	25,430	3,621 3,750	48,997		
S76						
G77						
V78	0,744 0,785	17,862 19,600				

Tabelle 5.3: Relaxationsdaten: R_1 , R_2 , und deren Verhältnis R_2/R_1 , jeweils mit Fehler

Amino- säure	R ₁ [s ⁻¹]			R ₂ [s ⁻¹]		R ₂ /R ₁	
A1							
T2							
G3							
S4							
P5							
V6	1,76647	± 0,0223	8,65801	± 0,0040	4,90122	± 0,25795	
A7	1,89394	± 0,0090	9,95025	± 0,0021	5,25381	± 0,14352	
E8	2,11595	± 0,0297	9,04159	± 0,0035	4,27297	± 0,30035	
C9	1,9992	± 0,0170	11,28668	± 0,0019	5,64759	± 0,22802	
V10	1,92049	± 0,0113	9,54198	± 0,0045	4,9685	± 0,23727	
E11	1,89072	± 0,0129	9,24214	± 0,0037	4,88819	± 0,20455	
Y12	1,81389	± 0,0218	12,87001	± 0,0026	7,09625	± 0,36931	
F13	2,07125	± 0,0228	13,55014	± 0,0040	6,54362	± 0,47272	
Q14							
S15	1,91022	± 0,0429	13,2626	± 0,0104	6,94487	± 1,11419	
W16							
R17							
Y18	2,27324	± 0,0443	13,98601	± 0,0050	6,15428	± 0,75450	
T19	1,84128	± 0,0387	17,4216	± 0,0029	9,45398	± 0,82895	
D20	2,08203	± 0,0136	9,72763	± 0,0103	4,67179	± 0,48635	
V21	1,91351	± 0,0162	10,04016	± 0,0041	5,2491	± 0,27137	
H22	1,90803	± 0,0208	8,27815	± 0,0020	4,33817	± 0,18641	
N23	1,98295	± 0,0136	9,42507	± 0,0062	4,75271	± 0,30732	
G24							
C25							
A26							
D27	1,77873	± 0,0142	9,38967	± 0,0103	5,27897	± 0,52772	
A28	1,90549	± 0,0232	8,81834	± 0,0072	4,62733	± 0,35709	
V29	1,84809	± 0,0143	10,70664	± 0,0100	5,79024	± 0,63637	
S30	1,79953	± 0,0082	8,88889	± 0,0018	4,93965	± 0,10839	
V31	1,94590	± 0,0106	11,04972	± 0,0030	5,67602	± 0,22234	
T32	2,09424	± 0,0088	10,91703	± 0,0041	5,21337	± 0,25102	

Tabelle 5.3 (Fortsetzung)

Amino -säure	R ₁ [s ⁻¹]		R ₂ [s ⁻¹]		R ₂ /R ₁	
V33	2,05804	± 0,0221	16,10306	± 0,0067	7,82337	± 0,91557
E34	1,98610	± 0,0183	11,08647	± 0,0088	5,57962	± 0,57880
Y35	1,86428	± 0,0258	10,16260	± 0,0109	5,45395	± 0,65908
T36	2,01207	± 0,0169	16,05136	± 0,0031	7,97744	± 0,48158
H37	2,61643	± 0,0348	11,50748	± 0,0046	4,39651	± 0,46368
G38	2,46548	± 0,0329	9,38967	± 0,0049	3,80797	± 0,35487
Q39						
W40	2,17865	± 0,0288	11,12347	± 0,0039	5,10510	± 0,39004
A41	1,91791	± 0,0309	9,14077	± 0,0117	4,76555	± 0,58248
P42						
C43	2,02511	± 0,0218	11,16071	± 0,0037	5,50995	± 0,33389
R44	2,05465	± 0,0183	11,75088	± 0,0027	5,71903	± 0,28039
V45	1,83925	± 0,0152	10,13171	± 0,0033	5,50767	± 0,24058
I46	1,82482	± 0,0119	7,88022	± 0,0115	4,31792	± 0,40229
E47	1,88857	± 0,0100	9,91080	± 0,0035	5,2477	± 0,20612
P48						
G49	1,99124	± 0,0103	10,64963	± 0,0045	5,34778	± 0,27963
G50	1,96271	± 0,0044	15,01502	± 0,0105	7,65286	± 1,20893
W51	2,00080	± 0,0172	10,61571	± 0,0045	5,30635	± 0,31418
A52	1,90223	± 0,0152	9,10747	± 0,0071	4,78737	± 0,33712
T53	2,54712	± 0,0411	16,75042	± 0,0040	6,57187	± 0,81355
F54	1,95695	± 0,0336	14,61988	± 0,0125	7,47202	± 1,45114
A55	2,31481	± 0,0649	14,06470	± 0,0104	6,07434	± 1,27395
G56	2,04290	± 0,0315	8,13670	± 0,0104	3,98253	± 0,42340
Y57	2,27376	± 0,0279	15,43210	± 0,0094	6,78481	± 1,07806
G58	2,54065	± 0,0338	11,22334	± 0,0061	4,41641	± 0,48500
T59						
D60	2,62605	± 0,0348	12,40695	± 0,0037	4,72278	± 0,48221
G61	2,37304	± 0,0310	10,01001	± 0,0046	4,21733	± 0,36720
N62	2,11685	± 0,0329	11,91895	± 0,0029	5,62916	± 0,43637
Y63	2,05508	± 0,0295	15,84786	± 0,0044	7,71561	± 0,71710
V64	2,06441	± 0,0253	12,69036	± 0,0049	6,14744	± 0,50081

Tabelle 5.3 (Fortsetzung)

Amino- säure	R ₁ [s ⁻¹]		R ₂ [s ⁻¹]		R ₂ /R ₁	
T65	2,01369	± 0,0161	12,57862	± 0,0040	6,24435	± 0,37601
G66	1,82017	± 0,0110	10,34126	± 0,0041	5,68340	± 0,26810
L67	1,83756	± 0,0162	10,72961	± 0,0023	5,84082	± 0,22620
H68	1,86567	± 0,0123	10,06036	± 0,0032	5,39200	± 0,21463
T69	2,16357	± 0,0255	12,90323	± 0,0026	5,96608	± 0,38415
C70	2,05297	± 0,0153	10,33058	± 0,0025	5,03400	± 0,20572
D71	2,11909	± 0,0526	9,708740	± 0,0074	4,58152	± 0,60635
P72						
A73	2,28624	± 0,0366	4,57457	± 0,0204	2,00070	± 0,25075
T74	1,97161	± 0,0492	5,06586	± 0,0064	2,56944	± 0,26261
P75						
S76	1,68237	± 0,0492	3,05904	± 0,0289	1,81810	± 0,22020
G77	1,53327	± 0,1070	2,26347	± 0,0809	1,47620	± 0,36300
V78	0,70671	± 0,0738	1,16591	± 0,1670	1,64980	± 0,33260

Tabelle 5.4: ^3J -Kopplungen, hetNOE mit Fehler und der Ordnungsparameter (S^2).

Amino- säure	$^3\text{J}(\text{HNHA})$	hetNOE			S^2	
A1						
T2	5,59557					
G3						
S4	9,36083					
P5						
V6	6,46942	0,63215	$\pm 0,01587$	0,849	$\pm 0,050$	
A7	3,22955	0,55739	$\pm 0,02282$	0,737	$\pm 0,036$	
E8	3,49637	0,66180	$\pm 0,03287$	0,605	$\pm 0,039$	
C9	7,07534	0,66257	$\pm 0,03291$	0,906	$\pm 0,030$	
V10	8,02826	0,69523	$\pm 0,03356$	0,882	$\pm 0,020$	
E11	8,99361	0,64900	$\pm 0,03198$	0,855	$\pm 0,022$	
Y12	7,40967	0,62805	$\pm 0,06801$	0,816	$\pm 0,035$	
F13	8,55457	0,63932	$\pm 0,06403$	0,82	$\pm 0,137$	
Q14						
S15						
W16						
R17						
Y18	9,28614	0,83214	$\pm 0,07898$			
T19	7,55252	0,75976	$\pm 0,10907$			
D20	6,65789	0,75025	$\pm 0,06252$	0,981	$\pm 0,027$	
V21	8,82924	0,70559	$\pm 0,05372$	0,892	$\pm 0,073$	
H22	8,48883	0,74504	$\pm 0,03305$	0,916	$\pm 0,014$	
N23	7,34379	0,80653	$\pm 0,06337$	0,994	$\pm 0,024$	
G24	3,90388 6,36412					
C25	6,12949					
A26	4,16722					
D27	8,86849	0,70633	$\pm 0,01435$	0,819	$\pm 0,021$	
A28	3,98522	0,78666	$\pm 0,01509$	0,938	$\pm 0,034$	
V29	9,03792	0,77071	$\pm 0,03343$	0,876	$\pm 0,023$	
S30	8,69152	0,71375	$\pm 0,02297$	0,867	$\pm 0,014$	
V31	8,66958	0,72332	$\pm 0,03081$	0,912	$\pm 0,020$	
T32	7,10149	0,66089	$\pm 0,02931$	0,713	$\pm 0,046$	

Tabelle 5.4 (Fortsetzung)

Amino- säure	3J(HNHA)	hetNOE		S ²	
V33	9,31552	0,62484	± 0,09171	0,654	± 0,118
E34	8,90316	0,67989	± 0,04836	0,719	± 0,069
Y35	8,21004	0,80591	± 0,05785	0,917	± 0,044
T36	3,90401	0,45002	± 0,03527	0,637	± 0,094
H37	7,29614	0,88567	± 0,05141		
G38	5,12435 7,29614	0,68960	± 0,03214	0,461	± 0,259
Q39	4,09912				
W40	5,9452	0,67027	± 0,03357	0,793	± 0,156
A41		0,74968	± 0,10131	0,921	± 0,048
P42					
C43	5,47298	0,64774	± 0,03854	0,919	± 0,054
R44	8,32763	0,75565	± 0,04498	0,85	± 0,082
V45	7,62588	0,68713	± 0,03952	0,91	± 0,027
I46	9,4939	0,78358	± 0,02695	0,892	± 0,019
E47	3,64534	0,79136	± 0,02941	0,989	± 0,016
P48					
G49	4,12113 5,64617	0,73416	± 0,02513	0,953	± 0,02
G50	5,22068 5,50029	0,74768	± 0,02454	0,913	± 0,01
W51	8,83195	0,71014	± 0,05119	0,929	± 0,034
A52	7,62447	0,82097	± 0,04556	0,901	± 0,026
T53	7,89983	0,74782	± 0,03583		± 0,983
F54	7,82463	0,69991	± 0,10515	0,959	± 0,063
A55		0,79136	± 0,09424		
G56	8,22229	0,80734	± 0,05169	0,938	± 0,048
Y57	8,02518	0,76755	± 0,07433		± 0,078
G58		0,80176	± 0,05134		± 0,065
T59					
D60	8,11477	0,68434	± 0,02960	0,165	± 0,228
G61	6,55332	0,56979	± 0,04067	0,433	± 0,21
N62		0,72201	± 0,04385	0,639	± 0,129
Y63		0,72935	± 0,06471	0,963	± 0,058
V64					

Tabelle 5.4 (Fortsetzung)

Amino- säure	3J(HNHA)	hetNOE		S ²	
T65	8,58512	0,75279	± 0,03607	0,964	± 0,032
G66	2,65632 3,77714	0,66858	± 0,02103	0,828	± 0,033
L67	7,50893	0,81781	± 0,05769	0,979	± 0,029
H68	8,07505	0,75625	± 0,11689	0,890	± 0,020
T69	6,55683	0,64379	± 0,02744	0,756	± 0,134
C70	6,94100	0,74346	± 0,02563	0,912	± 0,067
D71	8,25604	0,68478	± 0,02962	0,644	± 0,084
P72					
A73	6,17162	0,40094	± 0,01026	0,244	± 0,080
T74	6,93751	-0,03061	± 0,01021	0,410	± 0,026
P75					
S76	7,34690	-0,77607	± 0,02033	0,193	± 0,045
G77	7,44275	-1,42164	± 0,03357	0,103	± 0,065
V78	8,45345	-1,94810	± 0,01323	0,059	± 0,031

Abbildung 5. 1: Ensemble des Ramachandran Plot von Parvulustat der Aminosäuren 8-71.

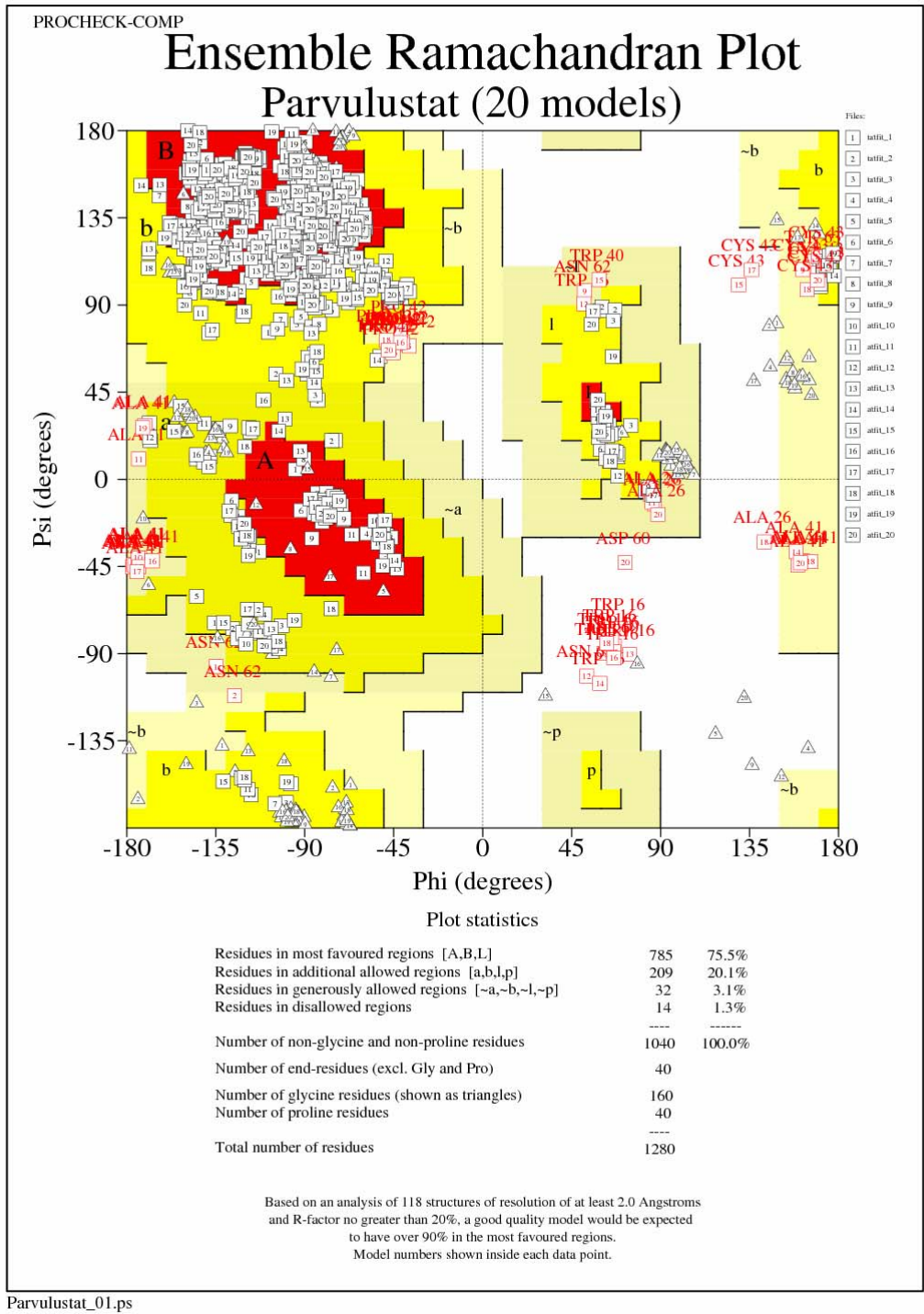


Abbildung 5.2: Ramachandranplot der einzelnen Aminosäuren (8-71) von Parvulostat für alle 20 Strukturen des Bündels.

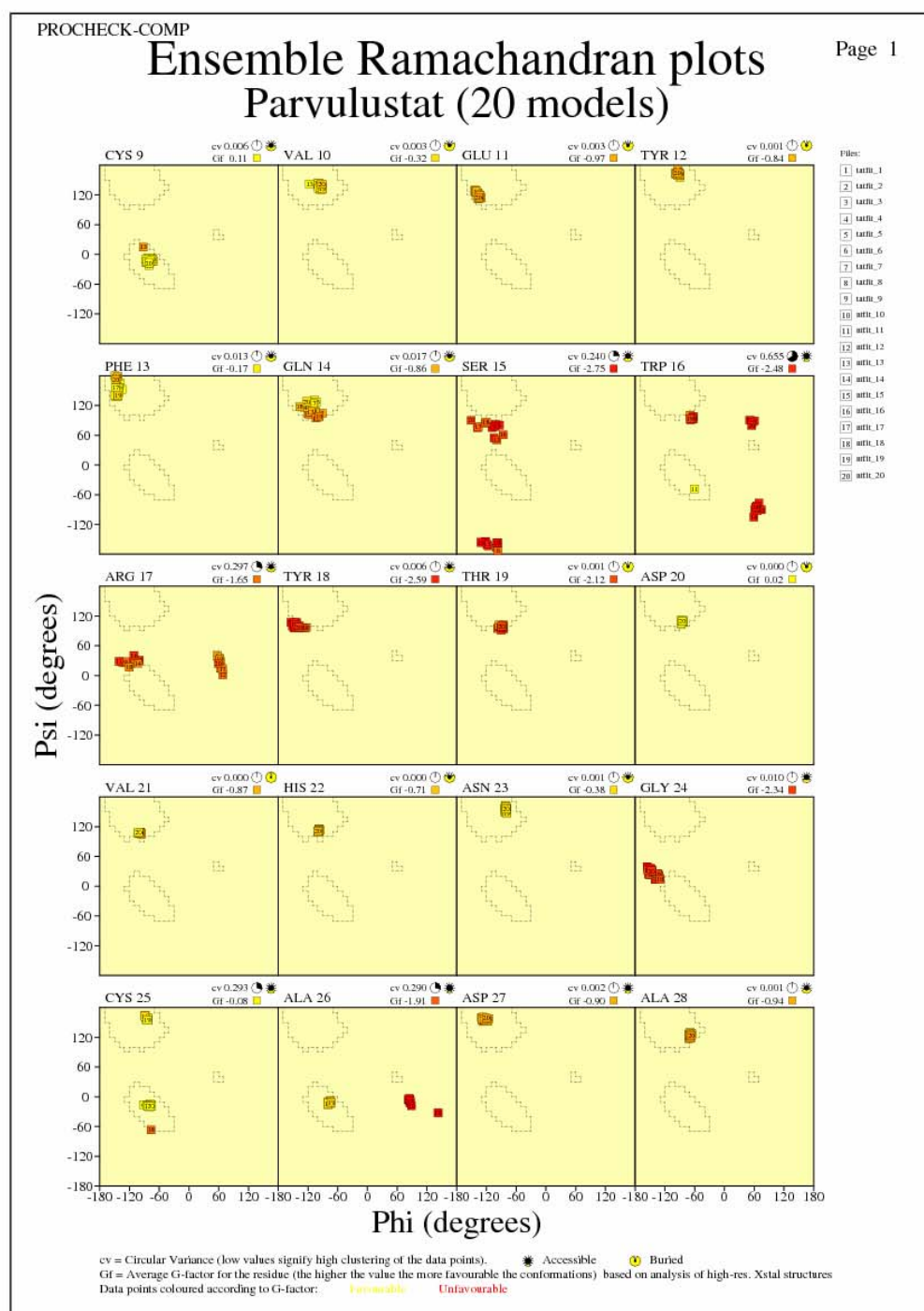


Abbildung 5.2 (Fortsetzung)

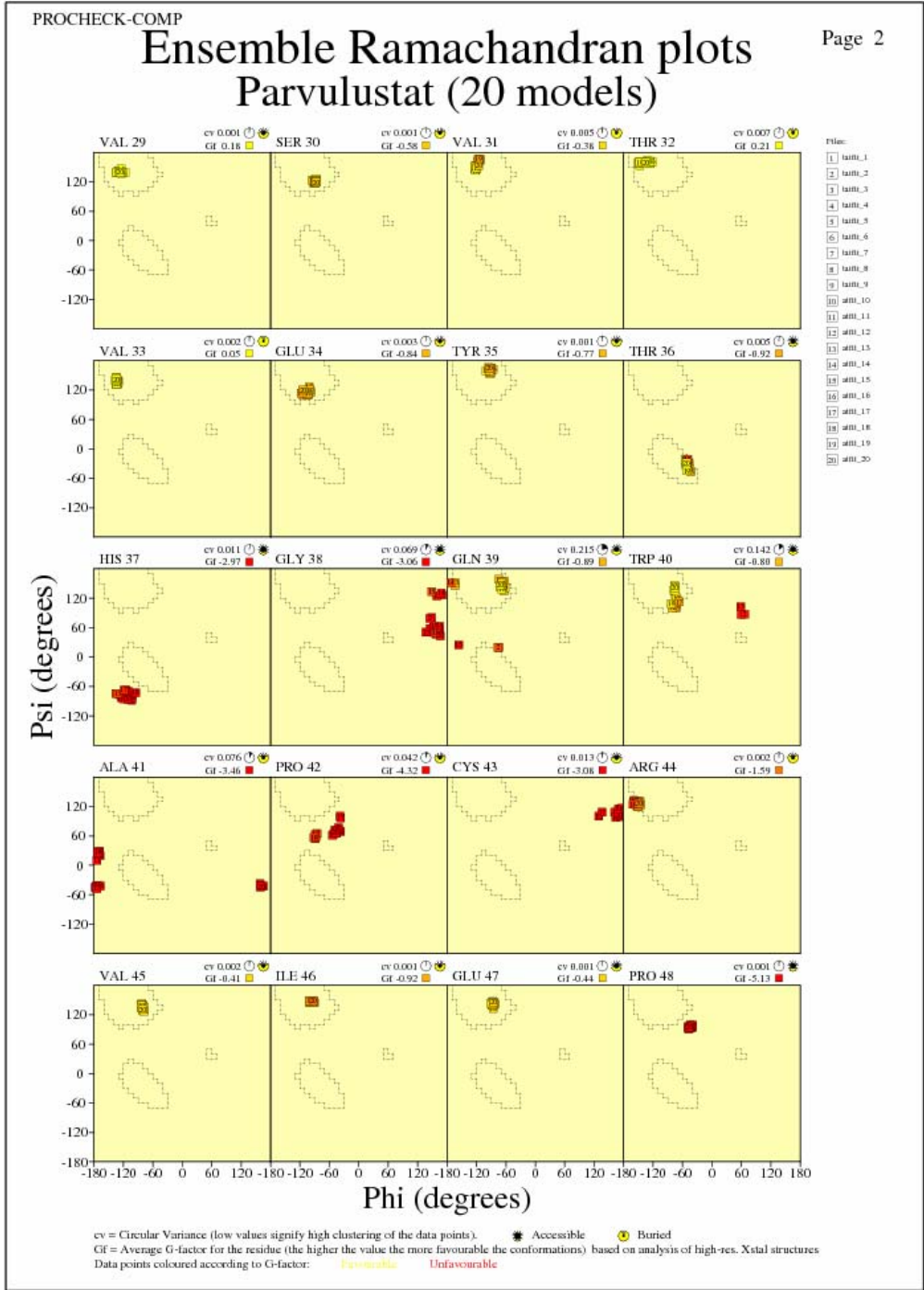


Abbildung 5.2 (Fortsetzung)

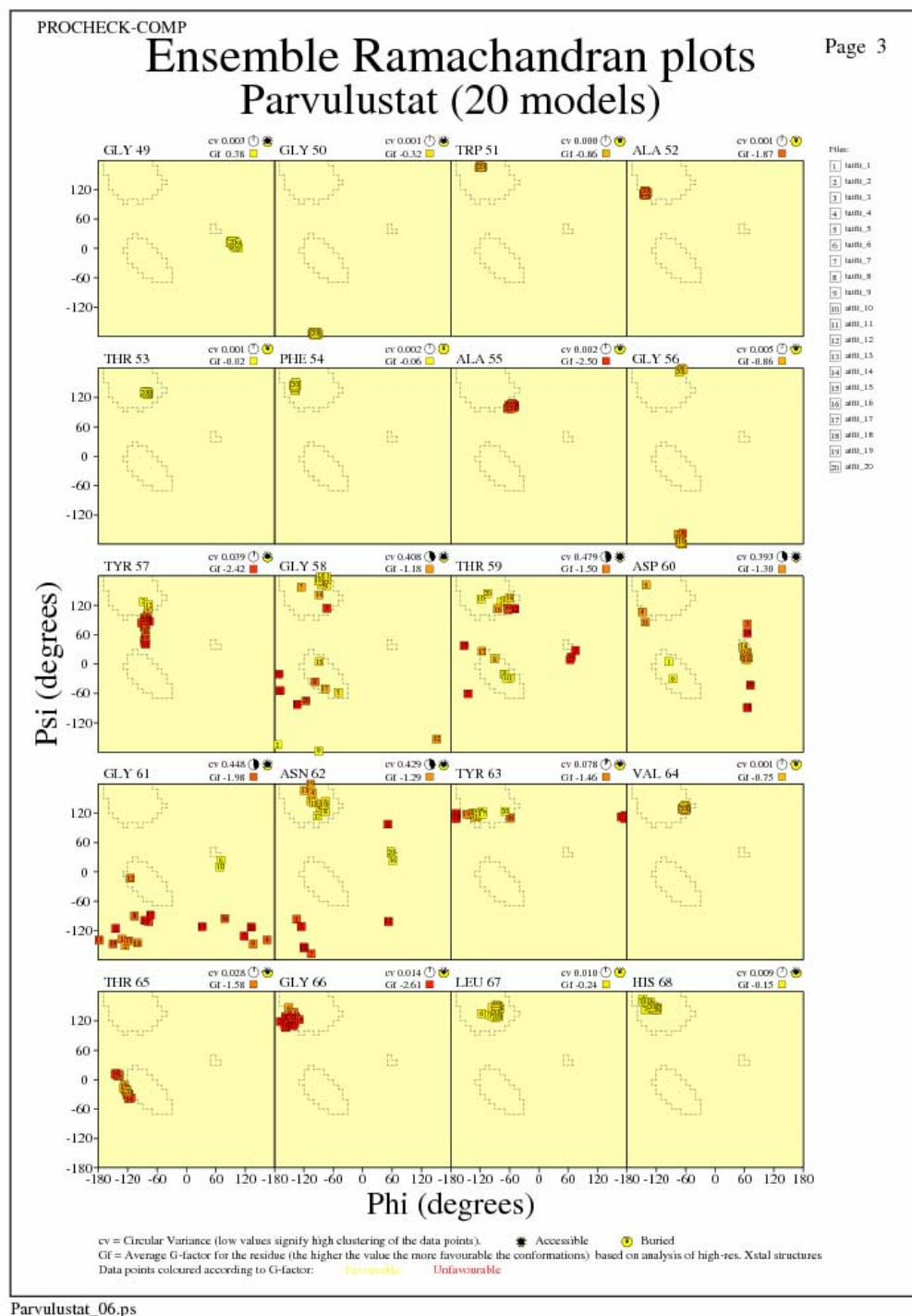


Abbildung 5.2 (Fortsetzung)

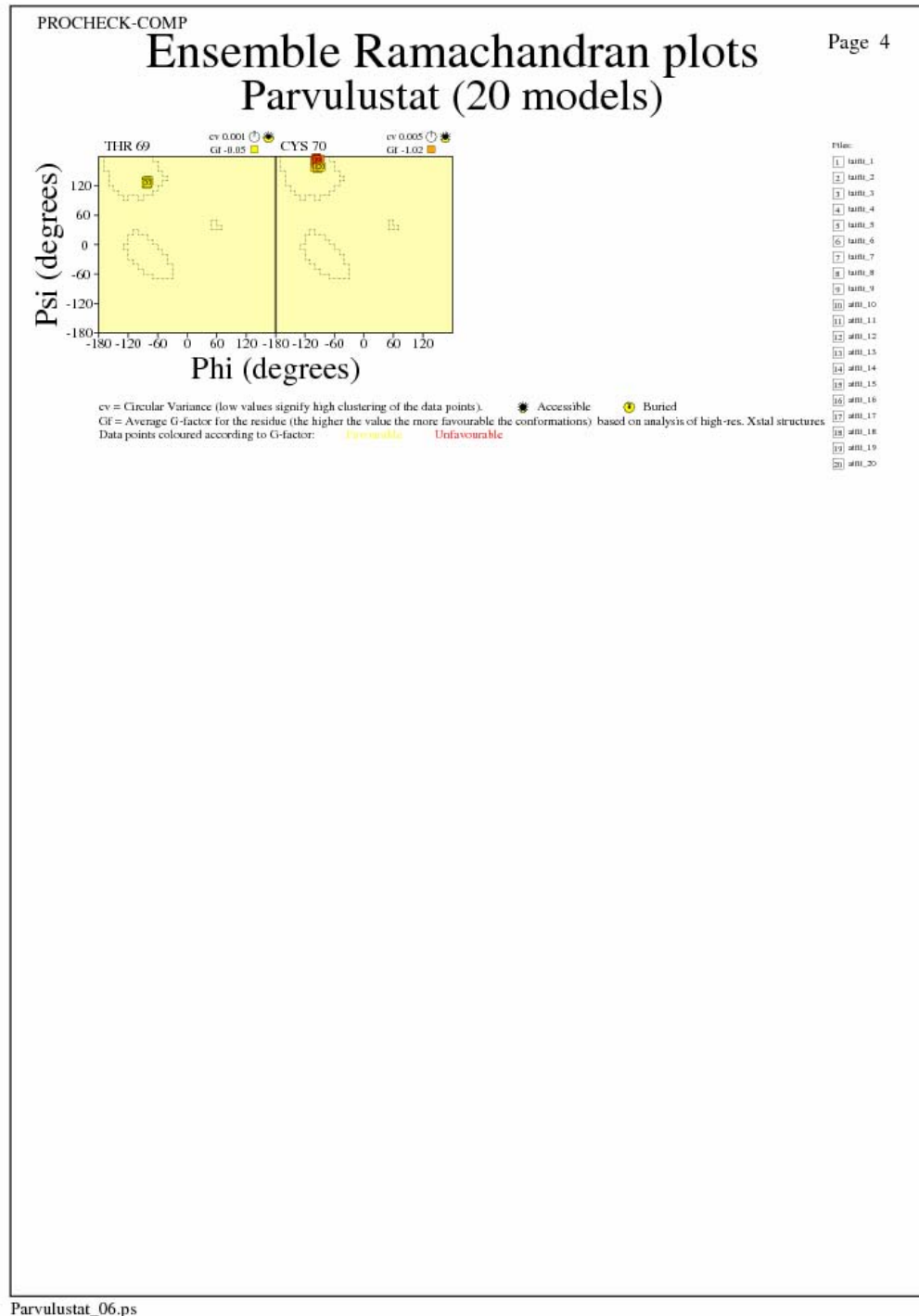


Abbildung 5.3: Eigenschaften der Aminosäuren in der von Parvulustat berechneten Struktur.

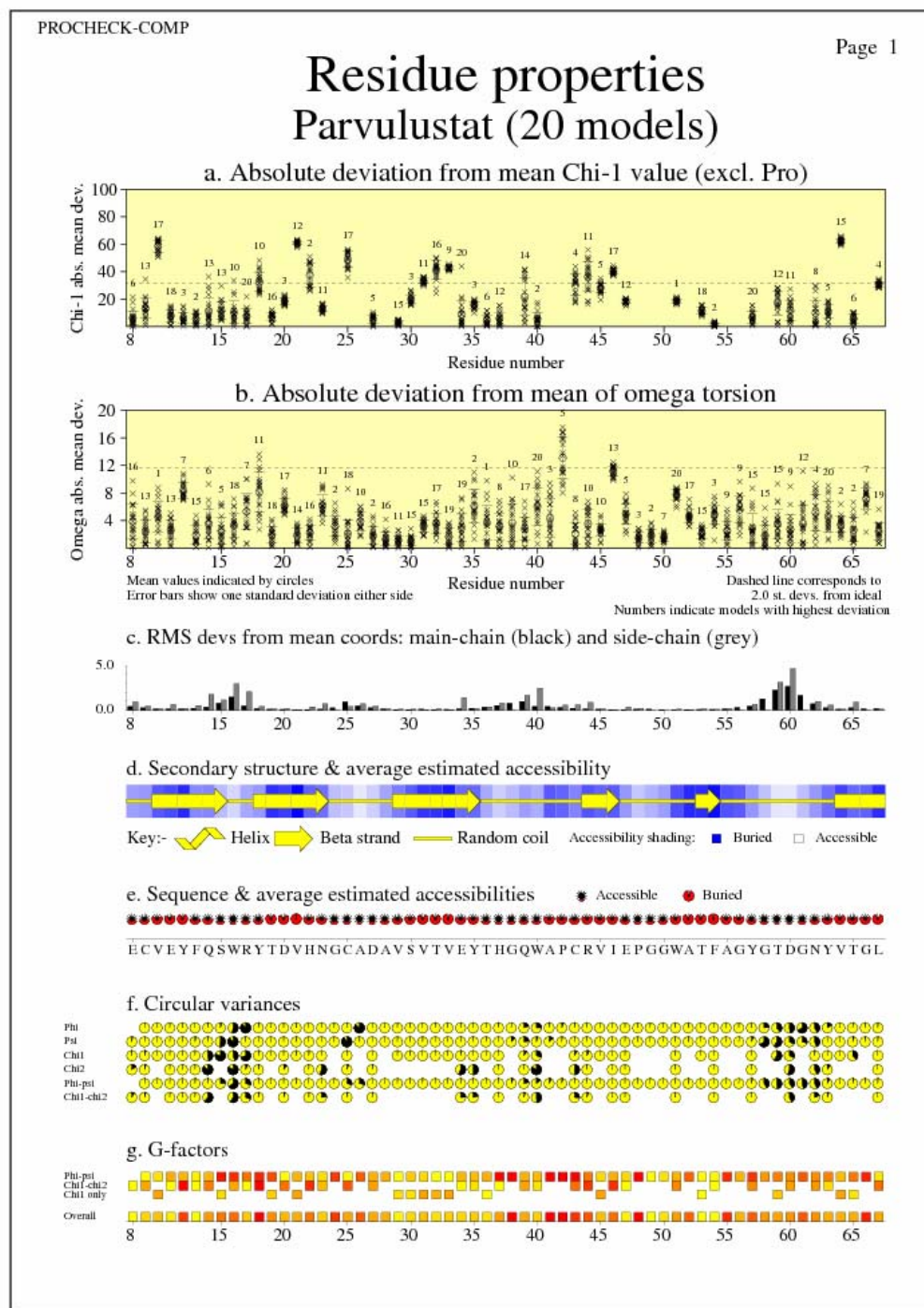
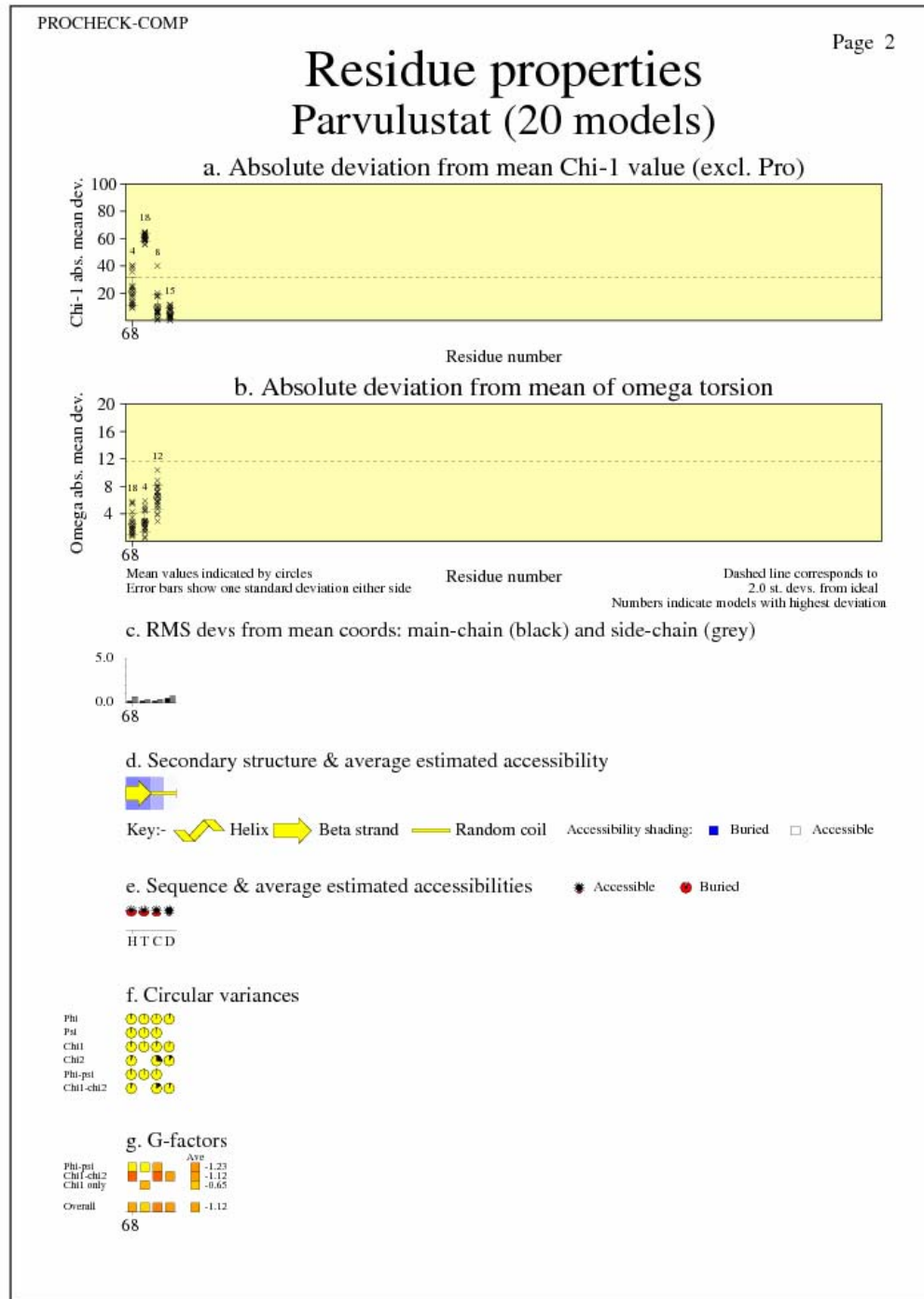


Abbildung 5.3 (Fortsetzung)



6. Literaturverzeichnis

- [1] C. Levinthal, *Are there pathways for protein folding?* Extrait du Journal de Chimie Physique 65 (1968) 44–45.
- [2] C. Levinthal, *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois*. Editors: J. T. P. DeBrunner and E. Münck (University of Illinois Press) (1969) 22-24.
- [3] J.M. Yon, *Protein folding in the post-genomic era*. J. Cell. Mol. Med. 6 (2002) 307-27.
- [4] C.B. Anfinsen, *Principles that govern the folding of protein chains*. Science 181 (1973) 223-30.
- [5] P.G. Wolynes, J.N. Onuchic und D. Thirumalai, *Navigating the folding routes*. Science 267 (1995) 1619-20.
- [6] R.M. Ballew, J. Sabelko und M. Gruebele, *Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events*. Nat. Struct. Mol. Biol. 3 (1996) 923-926.
- [7] O. Bieri und T. Kiefhaber, *Elementary steps in protein folding*. Biol. Chem. 380 (1999) 923-929.
- [8] O. Bieri, J. Wirz, B. Hellrung, M. Schutkowski, M. Drewello und T. Kiefhaber, *The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 9597-9601.
- [9] X. Daura, W.F. van Gunsteren und A.E. Mark, *Folding-unfolding thermodynamics of a beta-heptapeptide from equilibrium simulations*. Proteins: Struct., Funct., Genet. 34 (1999) 269-280.
- [10] K.A. Duan und P.A. Kollmann, *Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution*. Science 282 (1998) 740-744.
- [11] R. Gilmanishin, S. Williams, R.H. Callender, W.H. Woodruff und R.B. Dyer, *Fast events in protein folding: relaxation dynamics of secondary and tertiary structure in native apomyoglobin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 3709-3713.
- [12] C.Y. Huang, Z. Getahun, Y.J. Zhu, J.W. Klemke, W.F. DeGrado und F. Gai, *Helix formation via conformation diffusion search*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 2788-2793.
- [13] C.Y. Huang, S. He, W.F. DeGrado, D.G. McCafferty und F. Gai, *Light-induced helix formation*. J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 12674-12675.

- [14] V. Munoz, P.A. Thompson, J. Hofrichter und J. Eaton, *Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation*. Nature 390 (1997) 196-199.
- [15] P.A. Thompson, V. Munoz, G.S. Jas, E.R. Henry, W.A. Eaton und J. Hofrichter, *The helix-coil kinetics of a heteropeptide*. J. Phys. Chem. B 104 (2000) 378-389.
- [16] J.H. Werner, R.B. Dyer, R.M. Fesinmeyer und N.H. Andersen, *Dynamics of the primary processes of protein folding: Helix nucleation*. J. Phys. Chem. B 106 (2002) 487-494.
- [17] S. Williams, T.P. Causgrove, R. Gilmanshin, K.S. Fang, R.H. Callender, W.H. Woodruff und R.B. Dyer, *Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide*. Biochemistry 35 (1996) 691-697.
- [18] Y.Q. Zhou und M. Karplus, *Interpreting the folding kinetics of helical proteins*. Nature 401 (1999) 400-403.
- [19] Y. Kanematsu, H. Ozawa, I. Tanaka und S. Kinoshita, *Femtosecond optical Kerr-gate measurement of fluorescence spectra of dye solutions*. J. Lumin. 87-89 (2000) 917-919.
- [20] K.S.E. Eikema, J. Walz und T.W. Hänsch, *Continuous Wave Coherent Lyman-alpha Radiation*. Phys. Rev. Lett. 83 (1999) 3828.
- [21] G. De Belder, G. Schweitzer, S. Jordens, M. Lor, S. Mitra, J. Hofkens, S. De Feyter, M. Van der Auweraer, A. Herrmann, T. Weil, K. Müllen, F. C. De Schryver, *Singlet-Singlet Annihilation in Multichromophoric Peryleneimide Dendrimers, Determined by Fluorescence Upconversion*¹³. ChemPhysChem 2 (2001) 49-55.
- [22] J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl und P. Hamm, *Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 6452-6457.
- [23] D. Whitford, *Proteins: Structure and Function*, John Wiley & Sons Ltd., 2005.
- [24] M. Karplus, *Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance*. J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 2870-2872.
- [25] J. Wirmer, *Investigation of the kinetics of protein folding and the ensemble of conformations in non-native states of proteins by liquid NMR spectroscopy*. PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA (2005).

- [26] V. Tugarinov, W.Y. Choy, V.Y. Orekhov und L.E. Kay, *Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 622-7.
- [27] R. Keller, *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, Goldau, Schweiz: Cantina Verlag, 2004.
- [28] R.H. Fogh, W.F. Vranken, W. Boucher, T.J. Stevens und E.D. Laue, *A nomenclature and data model to describe NMR experiments*. J. Biomol. NMR 36 (2006) 147-55.
- [29] R. Fogh, J. Ionides, E. Ulrich, W. Boucher, W. Vranken, J.P. Linge, M. Habeck, W. Rieping, T.N. Bhat, J. Westbrook, K. Henrick, G. Gilliland, H. Berman, J. Thornton, M. Nilges, J. Markley und E. Laue, *The CCPN project: an interim report on a data model for the NMR community*. Nat. Struct. Biol. 9 (2002) 416-418.
- [30] P. Güntert, *Automated structure determination from NMR spectra*. Eur. Biophys. J. 38 (2009) 129-43.
- [31] B. Lopez-Mendez und P. Guntert, *Automated protein structure determination from NMR spectra*. J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 13112-22.
- [32] G.C. Hampson, J. M. Robertson, *Bond lengths and resonance in the cis-azobenzene molecule*. J. Chem. Soc. (1941) 409-413.
- [33] G.S. Hartley, *The cis-Form of Azobenzene and the Velocity of the thermal cis->trans-Conversion of Azobenzene and some Derivatives*. J. Chem. Soc. (1938) 633-642.
- [34] N. Biswas, S. Umapathy, *Wavepacket dynamical studies on trans-azobenzene: absorption spectrum and resonance Raman excitation profiles of the n-p* transition*. Chem. Phys. Lett. 236, (1995) 24-29.
- [35] I.K. Lednev, T.Q. Ye, R.E. Hester, J.N. Moore, *Femtosecond Time-Resolved UV-Visible Absorption Spectroscopy of trans-Azobenzene in Solution*. J. Phys. Chem. 100 (1996) 13338-13342.
- [36] H. Rau, *Further evidence for rotation in the pp* and inversion in the np* photoisomerization of azobenzenes*. J. Photochem. 26 (1984) 221-225.
- [37] W. Fuss, C. Kosmidis, W.E. Schmid und S.A. Trushin, *The photochemical cis-trans isomerization of free stilbene molecules follows a hula-twist pathway*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 43 (2004) 4178-82.

- [38] R.S.H. Liu und D.T. Browne, *A bioorganic view of the chemistry of vision: H.T.-n and B.P.-m,n mechanisms for reactions of confined, anchored polyenes*. Acc. Chem. Res. 19 (1986) 42-48.
- [39] A.M. Müller, S. Lochbrunner, W.E. Schmid und W. Fuß, *Tieftemperaturphotochemie von Prävitamin D: Hula-Twist-Isomerisierung eines Triens*. Angew. Chem. 110 (1998) 520-522.
- [40] S. Spörlein, *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München (2001).
- [41] H. Rau, *Spektroskopische Eigenschaften organischer Azoverbindungen*. Angew. Chem. 6 (1973) 248-258.
- [42] C. Renner und L. Moroder, *Azobenzene as conformational switch in model peptides*. ChemBioChem 7 (2006) 868-878.
- [43] H. Rau, *Azo Compounds*, In: *Studies in Organic Chemistry, Photochromism, Molecules and Systems*. Elsevier-Verlag, Amsterdam Bd. 40 (1990) 165-192.
- [44] P. Bortolus und S. Monti, *Cis-trans photoisomerization of azobenzene. Solvent and triplet donors effects*. J. Phys. Chem. 83 (1979) 648-652.
- [45] N. Siampiringue, G. Guyot, S. Monti und P. Bortolus, *The cis --> trans photoisomerization of azobenzene: an experimental re-examination*. J. Photochem. 37 (1987) 185-188.
- [46] H. Stegemeyer, *On the Mechanism of photochemical cis <-> trans Isomerisation*. J. Phys. Chem. 66 (1962) 2555-2560.
- [47] J. Ronayette, R. Arnaud, P. Lebourgeois, J. Lemaire, *Isomérisation photochimique de l'azobenzène en solution. I*. Can. J. Chem. 52 (1974) 1848-1857.
- [48] P.P. Birnbaum, D. W. G. Style, *The Photo-Isomerization of some Azobenzene Derivatives*. Trans. Faraday Soc. 50 (1954) 1192-1196.
- [49] R. Behrendt, *Photoschaltung von Konformation und Bioaktivität cyclischer Modellpeptide*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2000.
- [50] A.G. Milbradt, M. Löweneck, S.S. Krupka, M. Reif, E.-K. Sinner, L. Moroder und C. Renner, *Photomodulation of conformational states. IV. Integrin-binding RGD-peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent*. Biopolymers 77 (2005) 304-313.

- [51] J. Wachtveitl, S. Sporlein, H. Satzger, B. Fonrobert, C. Renner, R. Behrendt, D. Oesterhelt, L. Moroder und W. Zinth, *Ultrafast conformational dynamics in cyclic azobenzene peptides of increased flexibility*. Biophys. J. 86 (2004) 2350-2362.
- [52] C. Renner, R. Behrendt, N. Heim und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. III. Water-soluble bis-cysteiny-peptides with (4-aminomethyl) phenylazobenzoic acid as backbone constituent*. Biopolymers 63 (2002) 382-393.
- [53] C. Renner, J. Cramer, R. Behrendt und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)-phenylazobenzoic acid as backbone constituent*. Biopolymers 54 (2000) 501-514.
- [54] L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski,, *Photoregulation of cyclic peptide conformation*. J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 8466-8467.
- [55] M. Harada, M. Sisido, J. Hirose und M. Nakanishi, *Photoreversible antigen-antibody reactions*. FEBS Lett. 286 (1991) 6-8.
- [56] D. Liu, J. Karanicolas, C. Yu, Z. Zhang und G.A. Woolley, *Site-specific incorporation of photoisomerizable azobenzene groups into ribonuclease S*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 7 (1997) 2677-2680.
- [57] R. Behrendt, C. Renner, M. Schenk, F. Wang, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt und L. Moroder, *Photomodulation of the conformation of cyclic peptides with azobenzene moieties in the peptide backbone*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 38 (1999) 2771-2774.
- [58] R. Behrendt, M. Schenk, H.-J. Musiol und L. Moroder, *Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties*. J. Pept. Sci. 5 (1999) 519-529.
- [59] J. Bredenbeck, Helbing, J., Kumita, J.R., Woolley, G.A., Hamm, P., *alpha-Helix formation in a photoswitchable peptide tracked from picoseconds to microseconds by time-resolved IR spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 2379-2384.
- [60] G.A. Woolley, *Photocontrolling peptide alpha helices*. Acc. Chem. Res. 38 (2005) 486-93.
- [61] Z. Zhang, D.C. Burns, J.R. Kumita, O.S. Smart und G.A. Woolley, *A water-soluble azobenzene cross-linker for photocontrol of peptide conformation*. Bioconjug. Chem. 14 (2003) 824-829.
- [62] L. Ulysse und J. Chmielewski, *The Synthesis of a Light-Switchable Amino-Acid for Inclusion into Conformationally Mobile Peptides*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 4 (1994) 2145-2146.

- [63] B. Priewisch und K. Rück-Braun, *Efficient preparation of nitrosoarenes for the synthesis of azobenzenes*. J. Org. Chem. 70 (2005) 2350-2.
- [64] P. Maine, D. Strickland, P. Bado, M. Pessot, G. Mourou, *Generation of ultrahigh peak power pulses by chirped pulse amplification*. IEEE J. Quantum Electron. 24 (1988) 398-403.
- [65] D. Strickland, G. Mourou, *Compression of amplified chirped optical pulses*. Opt. Commun. 55 (1985) 447-449.
- [66] M.K. Reed, M. K. Steinershepard, M. S. Armas, D. K. Negus, *Microjoule-Energy Ultrafast Optical Parametric Amplifiers*. J. Opt. Soc. Am. B 12 (1995) 2229-2236.
- [67] M.O. Lenz, *Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen photoinduzierter Ladungstransferreaktionen*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (2005).
- [68] S.A. Kovalenko, A.L. Dobryakov, J. Ruthmann und N.P. Ernsting, *Femtosecond spectroscopy of condensed phases with chirped supercontinuum probing*. Phys. Rev. A 59 (1999) 2369-2384.
- [69] R. Huber, J.E. Moser, M. Gratzel und J. Wachtveitl, *Observation of photoinduced electron transfer in dye/semiconductor colloidal systems with different coupling strengths*. Chem. Phys. 285 (2002) 39-45.
- [70] D.E. Robertson, S.F. Farid, C.M. Moser, J.L. Urbauer, S.E. Mulholland, R. Pidikiti, J.D. Lear, A.J. Wand, W.F. DeGrado und P.L. Dutton, *Design and synthesis of multi-haem proteins*. Nature 368 (1994) 425-432.
- [71] B.R. Gibney, F. Rabanal, J.J. Skalicky, A.J. Wand und P.L. Dutton, *Design of a Unique Protein Scaffold for Maquettes*. J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 2323-2324.
- [72] S. Rehm, M.O. Lenz, S. Mensch, H. Schwalbe und J. Wachtveitl, *Ultrafast spectroscopy of a photoswitchable 30-amino acid de novo synthesized peptide*. Chem. Phys. 323 (2006) 28-35.
- [73] S. Spörlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth und J. Wachtveitl, *Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (2002) 7998-8002.
- [74] H. Satzger, Spörlein, S., Root, C., Wachtveitl, J., Zinth, W., Gilch, P., *Fluorescence spectra of trans- and cis-azobenzene-emission from the Franck-Condon state*. Chem. Phys. Lett. 372 (2003) 216-223.

- [75] H. Satzger, C. Root, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl und W. Zinth, *Picosecond dynamics in water-soluble azobenzene-peptides*. Chem. Phys. Lett. 396 (2004) 191-197.
- [76] H. Aschauer, L. Vértesy, G. Nesemann und G. Braunitzer, *Die Primärstruktur des alpha-Amylaseinhibitors Hoe 467A aus Streptomyces tendae* 4158. *Eine neue Klasse von Inhibitoren*. Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem. 364 (1983) 1347-1356.
- [77] V. Oeding, H. Neubauer, L. Vertesy und H.L. Weidenmueller, *alpha-Amylase inhibitor from Streptomyces*. Chem. Abstr. 90 (1979) 4438e.
- [78] S. Murao, A. Goto, Y. Matsui und K. Ohyama, *New proteinous inhibitor (Haim) of animal alpha-amylase from Streptomyces griseosporus YM-25*. Agric. Biol. Chem. 44 (1980) 1679-1681.
- [79] S. Murao, N. Oouchi, A. Goto und M. Arai, *New Proteinaceous alpha-Amylase Inhibitor (Paim) from Streptomyces corchorusii*. Agric. Biol. Chem. 47 (1983) 453-454.
- [80] L. Vertesy und D. Tripiier, *Isolation and structure elucidation of an alpha-amylase inhibitor, AI-3688, from Streptomyces aureofaciens*. FEBS Lett. 185 (1985) 187-90.
- [81] K. Katsuyama, N. Iwata und A. Shimazu, *Purification and primary structure of proteinous alpha-amylase inhibitor from Streptomyces chartreusis*. Biosci., Biotechnol., Biochem. 56 (1992) 1949-54.
- [82] J. Sumitani, T. Kawaguchi, N. Hattori, S. Murao und M. Arai, *Molecular cloning and expression of proteinaceous alpha-amylase inhibitor gene from Streptomyces nitrosporeus in Escherichia coli*. Biosci., Biotechnol., Biochem. 57 (1993) 1243-8.
- [83] A.D. Kline, W. Braun und K. Wüthrich, *Studies by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the alpha-amylase inhibitor tendamistat*. J. Mol. Biol. 189 (1986) 377-82.
- [84] A.D. Kline und K. Wüthrich, *Complete sequence-specific 1H nuclear magnetic resonance assignments for the alpha-amylase polypeptide inhibitor tendamistat from Streptomyces tendae*. J. Mol. Biol. 192 (1986) 869-90.
- [85] J.W. Pflugrath, G. Wiegand, R. Huber und L. Vertesy, *Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the [alpha]-amylase inhibitor Hoe-467A*. J. Mol. Biol. 189 (1986) 383-386.

- [86] G. Wiegand, O. Epp und R. Huber, *The Crystal Structure of Porcine Pancreatic α -Amylase in Complex with the Microbial Inhibitor Tendamistat*. J. Mol. Biol. 247 (1995) 99-110.
- [87] A.D. Kline, W. Braun und K. Wüthrich, *Determination of the complete three-dimensional structure of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in aqueous solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry*. J. Mol. Biol. 204 (1988) 675-724.
- [88] H. Schwalbe, Kurt Wüthrich, the ETH Zürich, and the Development of NMR Spectroscopy for the Investigation of Structure, Dynamics, and Folding of Proteins. ChemBioChem 4 (2003) 135-142.
- [89] M. Billeter, A.D. Kline, W. Braun, R. Huber und K. Wüthrich, *Comparison of the high-resolution structures of the alpha-amylase inhibitor tendamistat determined by nuclear magnetic resonance in solution and by X-ray diffraction in single crystals*. J. Mol. Biol. 206 (1989) 677-87.
- [90] W. Braun, O. Epp, K. Wüthrich und R. Huber, *Solution of the phase problem in the X-ray diffraction method for proteins with the nuclear magnetic resonance solution structure as initial model. Patterson search and refinement for the alpha-amylase inhibitor tendamistat*. J. Mol. Biol. 206 (1989) 669-76.
- [91] M. Renner, H.J. Hinz, M. Scharf und J.W. Engels, *Thermodynamics of unfolding of the alpha-amylase inhibitor tendamistat. Correlations between accessible surface area and heat capacity*. J. Mol. Biol. 223 (1992) 769-79.
- [92] T. Vogl, R. Brengelmann, H.J. Hinz, M. Scharf, M. Lotzbeyer und J.W. Engels, *Mechanism of protein stabilization by disulfide bridges: calorimetric unfolding studies on disulfide-deficient mutants of the alpha-amylase inhibitor tendamistat*. J. Mol. Biol. 254 (1995) 481-96.
- [93] S. Han, *Gensynthese und Expression des alpha-Amylaseinhibitors Parvulostat (Z-2685)*. Diplomarbeit, Goethe University Frankfurt (1998).
- [94] S. Henikoff und J.G. Henikoff, *Amino acid substitution matrices from protein blocks*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 10915-9.
- [95] T.A. Hall, *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symp. Ser. 41 (1999) 95-98.
- [96] J.L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C.W. Hilbers, R. Kaptein, B.D. Sykes, P.E. Wright und K. Wüthrich, *Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy*. J. Biomol. NMR 12 (1998) 1-23.

- [97] C. Bartels, T. Xia, M. Billeter, P. Güntert und K. Wüthrich, *The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules*. J. Biomol. NMR 6 (1995) 1-10.
- [98] T.D. Goddard und D.G. Kneller, *Sparky 3*. University of California, San Francisco.
- [99] R. Clubb, V. Thanabal und G. Wagner, *A constant-time 3D triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1H , ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C -labeled proteins*. J. Magn. Reson. 97 (1992) 213-217.
- [100] L.E. Kay, G.Y. Xu und T. Yamazaki, *Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H_2O Saturation*. J. Magn. Reson. A 109 (1994) 129-133.
- [101] S. Grzesiek und A. Bax, *Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein*. J. Magn. Reson. 96 (1992) 432-440.
- [102] D.R. Muhandiram und L.E. Kay, *Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity*. J. Magn. Reson. B 103 (1994) 203-216.
- [103] M. Wittekind und L. Mueller, *HNCACB, a high sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide proton and nitrogen resonances with the α - and β -carbon resonances in proteins*. J. Magn. Reson. B 101 (1993) 201-205.
- [104] S. Grzesiek und A. Bax, *Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins*. J. Biomol. NMR 3 (1993) 185-204.
- [105] L.E. Kay, G.Y. Xu, A.U. Singer, D.R. Muhandiram und J.D. Formankay, *A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ^1H and ^{13}C Correlations in H_2O Samples of Proteins*. J. Magn. Reson. B 101 (1993) 333-337.
- [106] A.L. Davis, J. Keeler, E.D. Laue und D. Moskau, *Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients*. J. Magn. Reson. 98 (1992) 207-216.
- [107] L. Kay, P. Keifer und T. Saarinen, *Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity*. J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 10663-10665.
- [108] A.G. Palmer, J. Cavanagh, P.E. Wright und M. Rance, *Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy*. J. Magn. Reson. 93 (1991) 151-170.
- [109] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletsky, S. Glaser, O. Sorensen und C. Griesinger, *A general enhancement scheme in*

heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. J. Biomol. NMR 4 (1994) 301-306.

[110] G. Lippens, C. Dhalluin und J. Wieruszeski, *Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment*. J. Biomol. NMR 5 (1995) 327-331.

[111] M. Piotto, V. Saudek und V. Sklenar, *Gradient tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy for gradient solutions*. J. Biomol. NMR 2 (1992) 661-665.

[112] V. Sklenar, *Suppression of Radiation Damping in Multidimensional NMR Experiments Using Magnetic Field Gradients*. J. Magn. Reson. A 114 (1995) 132-135.

[113] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik und V. Saudek, *Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity*. J. Magn. Reson. A 102 (1993) 241-245.

[114] G. Vuister und A. Bax, *Quantitative J Correlation: a new approach for measuring homonuclear 3-bond J (H (N) H (Alpha) coupling-constants in N-15-enriched proteins*. J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 7772-7777.

[115] G. Vuister und A. Bax, *Measurement of four-bond H N-H α J-couplings in staphylococcal nuclease*. J. Biomol. NMR 4 (1994) 193-200.

[116] P. Schanda und B. Brutscher, *Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds*. J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 8014-8015.

[117] M. Sattler, J. Schleucher, C., Griesinger, *Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of protein employing pulsed field gradients*. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 34 (1999) 93-158.

[118] E. Duchardt, *Development of new Parameters for Structure Determination and Dynamic Investigations on Biomacromolecules by NMR*. PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA (2005).

[119] C. Schlörb, *NMR-based Structural and Dynamical Studies on Non-Native Variants of Hen Egg hite Lysozyme*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (2007).

[120] P. Dosset, J.C. Hus, M. Blackledge und D. Marion, *Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data*. J. Biomol. NMR 16 (2000) 23-8.

[121] A.M. Mandel, M. Akke und A.G. Palmer, *Backbone Dynamics of Escherichia coli Ribonuclease HI: Correlations with Structure and Function in an Active Enzyme*. J. Mol. Biol. 246 (1995) 144-163.

- [122] A.G. Palmer, M. Rance und P.E. Wright, *Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance carbon-13 heteronuclear NMR spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 4371-4380.
- [123] J.P. Linge, S.I. O'Donoghue und M. Nilges, *Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA*. Methods Enzymol. 339 (2001) 71-90.
- [124] A.T. Brunger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson und G.L. Warren, *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. 54 (Pt 5) (1998) 905-21.
- [125] J.P. Linge und M. Nilges, *Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: a new force field for NMR structure calculation*. J. Biomol. NMR 13 (1999) 51-9.
- [126] G. Cornilescu, F. Delaglio und A. Bax, *Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology*. J. Biomol. NMR 13 (1999) 289-302.
- [127] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss und J.M. Thornton, *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Crystallogr. 26 (1993) 283-191.
- [128] R.A. Laskowski, J.A. Rullmannn, M.W. MacArthur, R. Kaptein und J.M. Thornton, *AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*. J. Biomol. NMR 8 (1996) 477-86.
- [129] D.S. Wishart und B.D. Sykes, *Chemical shifts as a tool for structure determination*. Methods Enzymol. 239 (1994) 363-92.
- [130] Y. Wang und O. Jardetzky, *Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data*. Protein Sci. 11 (2002) 852-861.
- [131] R. Koradi, M. Billeter und K. Wüthrich, *MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures*. J. Mol. Graph. Model. 14 (1996) 51-55.
- [132] W.L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*. (2008).
- [133] A.D. Kline und K. Wüthrich, *Secondary structure of the alpha-amylase polypeptide inhibitor tendamistat from Streptomyces tendae determined in solution by ¹H nuclear magnetic resonance*. J. Mol. Biol. 183 (1985) 503-7.

- [134] L. Vertesy, V. Oeding, R. Bender, K. Zepf und G. Neesemann, *Tendamistat (HOE 467), a tight-binding alpha-amylase inhibitor from Streptomyces tendae 4158. Isolation, biochemical properties*. FEBS J. 141 (1984) 505-512.
- [135] S. Rehm, S. Han, I. Hassani, A. Sokocevic, H.R. Jonker, J.W. Engels und H. Schwalbe, *The high resolution NMR structure of parvulostat (Z-2685) from Streptomyces parvulus FH-1641: comparison with tendamistat from Streptomyces tendae 4158*. ChemBioChem 10 (2009) 119-27.
- [136] M. Machius, L. Vertesy, R. Huber und G. Wiegand, *Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic alpha-amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics*. J. Mol. Biol. 260 (1996) 409-21.

Danksagung

Es war eine lange und ereignisreiche Zeit, die ich hier im Arbeitskreis Schwalbe verbringen durfte. Ich hätte das alles nicht geschafft, wenn ich nicht die Hilfe von vielen, vielen Leuten gehabt hätte, die sich in dieser Zeit mehr oder weniger zufällig in meiner Nähe befunden haben:

Mein erster Dank geht natürlich an meinen Doktorvater **Prof. Harald Schwalbe**, der mir, obwohl er mich nicht kannte und nur einmal getroffen hatte, ermöglicht hat meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Vielen Dank für die unglaublichen Vorraussetzungen, das zwar oft kurze dann aber immer sehr intensive Interesse an meinen Projekten und die vielen Ideen, die für mich von großem Nutzen waren. Sehr bedanken möchte ich mich auch für die überaus großzügigen Möglichkeiten, meine Ergebnisse auf vielen Konferenzen und Tagungen überall auf der Welt präsentieren zu dürfen.

Ich danke hiermit auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Schwalbe, mit denen ich hier eine tolle Zeit hatte: **Dr. Karin Abarca Heidemann, Dr. Nuria Aboitiz, Dr. Katrin Ackermann, Prof. Hashim Al Hashimi, Dr. Aphrodite Anastasiadis-Pool, Marie Anders-Maurer, Tomislav Argirevic, Neda Bakhtiari, Katja Barthelmes, Dr. Holger Berk, Anna Bischoff, Janina Buck, Florian Buhr, Dr. Aleksejs Cerepanov, Dr. Emily Collins, Dr. Elke Duchardt, Jan-Peter Ferner, Dr. Boris Fürtig, Christian Gerum, Dr. Artur Gieldon, Dr. Jürgen Graf, Dr. Steffen Grimm, Martin Hähne, Friederike Heinicke, Fabian Hiller, Dr. Serge Ilin, Dr. Henry Jonker, Ajit Paul Kaur, Melanie Koschinat, Jitendra Kumar, Anna Lena Lieblein, Tanja Machnik, Vijayalaxmi Manoharan, Daniel Mathieu, Sarah Mensch, Hillary Moberly, Dr. Muruga Poopathi Raja, Dr. Hamid Nasiri, Gerd Nielsen, Dr. Jonas Noeske, Senada Nozinovic, Anke Reining, Dr. Christian Richter, Jörg Rinnenthal, Dr. Kai Schlepckow, Dr. Christian Schlörb, Dr. Nicole Schmut, Robert Silvers, Sridhar Sreeramulu, Max Stadler, Jochen Stehle, Elke Stinal, Anna Wacker, Dominic Wagner, Dr. Karla Werner, Dr. Julia Wirmer-Bartoschek, Prof. Jens Wöhnert, Dr. Johannes Gottfried Zimmermann.**

Als nächstes möchte ich der Person danken, ohne die diese Arbeit wohl nicht beendet worden wäre. Nachdem er mich zu einem Vortrag beim BMRZ-Meeting ermuntert hatte, musste sich **Dr. Henry Jonker** sehr lange mit mir abmühen, bis wir endlich sagen konnten: Ja! Die Struktur ist fertig! Henry, vielen Dank für alles, ich wünsche Dir alles Gute, noch viele schöne Strukturen und viel Erfolg für Feyenoord!

Weiterhin möchte ich auch **Sarah Mensch** meinen großen Dank ausdrücken. Ohne sie hätte ich wahrscheinlich sehr viel länger gebraucht ein vernünftiges

Peptid zu synthetisieren, sie war die große Hilfe am Synthesizer sowie an der HPLC und eine sehr angenehme Kollegin im OC-Labor. Auch als Innenarchitektin des noch leeren „middle-room“ hat sie sich einen Namen gemacht.

Ein Dank geht auch in die USA zu **Dr. Sergey Illin**, mit dessen Hilfe ich die ersten Gehversuche an NMR-Spektrometern mit mehr als 200 MHz gemacht habe und der eine große Hilfe am Anfang des Parvulostat-Projekts war.

Für unschätzbare Hilfe am Spektrometer möchte ich mich bei **Dr. Christian Richter, Dr. Henry Jonker, Prof. Jens Wöhnert und Dr. Johannes Gottfried Zimmermann** bedanken.

Als nächstes möchte ich mich bei **Prof. Wachtveitl** bedanken, der der Mastermind im Azozeptid-Projekt war, immer ein offenes Ohr für mich hatte (wenn ich ihn mal gefunden hatte) und mich auch höchst integrativ auf mehrere Seminarfahrten des IPTC eingeladen hat (die übrigens immer sehr viel Spaß gemacht haben – ganz besonders die Schneeschuhnachtwanderung!). Damit einher geht auch der Dank an seinen Arbeitskreis (sowie der Arbeitskreise **Dreuw** und **Stock**), die mich des Öfteren (unfreiwillig) mit Kuchen durchgefüttert haben. Vielen Dank, es war immer sehr lecker!

Besonders bedanken im Arbeitskreis Wachtveitl möchte ich mich jedoch bei **Dr. Martin Lenz**, der für die Femtosekunden-Messungen im Azozeptid-Projekt hauptverantwortlich war und auch in der Publikation einen nicht zu unterschätzenden Teil der Last schulterte. Trotz seiner komplexen Apparaturen hat er nie den Überblick verloren und sich nebenbei noch herrliche Diskussionen über alles Mögliche mit **Karsten Neumann** geliefert, dem ich hiermit auch für viele lustige Stunden danken möchte.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei **Thomas Köhler**, der mir mit einer bemerkenswerten Ausdauer bei vielen weiteren Messungen eine große Hilfe, Leidensgenosse und Ansprechpartner war. Ebenso für Hilfe bei verschiedenen Messungen danke ich auch **Lars Dworak**.

Für spontane Hilfe in letzter Sekunde möchte ich mich herzlich bei **Gabriele Schäfer** aus dem Arbeitskreis von **Prof. Mänteles** bedanken.

Ein weiterer Dank geht an **Prof. Joachim Engels** und seine Mitarbeiter **Dr. Sigeng Han, Ismail Hassani** und **Alma Sokocevic** für die Bereitstellung der Parvulostat-Proben, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bei der Publikation.

Besonders bedanken möchte ich mich bei unserem Sekretariat, namentlich **Anna Paulus** und **Elena Hartmann**, nicht nur für die viele Arbeit mit unseren Verwaltungsangelegenheiten (und noch 1000 andere Sachen) sondern auch für manch gemütlichen Abend bei einem Gläschen Wein, wofür auch dem „Wein-Komitee“ mit **Janina Buck** und **Daniel Mathieu** gedankt sei.

Bedanken möchte ich mich auch für den hervorragenden Tech-Support in der Arbeitsgruppe, besonders bei **Martin Hähnke**, aber auch bei **Daniel Mathieu**, **Fabian Hiller**, **Jan Ferner** und **Dr. Christian Schlörb**.

Weiterhin möchte ich mich generell bei allen Mitarbeitern der Serviceabteilungen des Instituts für Organische Chemie und Chemische Biologie bedanken, besonders bei **Dr. Johannes Gottfried Zimmermann** und **Reinhard Olbrich** in der NMR-Abteilung, sowie bei **Hannelore Brill** und **Ilona Prieß** für die vielen Massenspektren.

In diesem Zusammenhang sei auch **Dr. Ute Bahr** aus dem Arbeitskreis **Karas** gedankt.

Ein weiterer großer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder des „middle room“: **Dr. Karin Abarca Heidemann**, **Jitendra Kumar**, **Tanja Machnik**, **Dr. Jonas Noeske** und **Sridhar Sreeramulu**. Die besondere Atmosphäre dieses Raumes ist wohl nur den (ehemaligen) „Insassen“ klar: ob wir nun Anlaufstelle für Süßigkeiten waren, oder ob des Kühlschranks und seines Inhaltes, oder aber Kummerkasten und Versteck für den einen oder anderen – es war immer etwas los! Vielen Dank Euch allen für die tolle gemeinsame Zeit!

Ein großer Dank geht auch an meine ehemaligen und aktuellen Mitbewohner **Anna**, **Ferdinand** und **Giuseppe**, die in dieser Zeit hin und wieder meine schlechte Laune zu ertragen hatten, ebenso an alle anderen Freunde, die mir in dieser Zeit immer wenn es nötig war Ablenkung verschafften.

Der größte Dank geht an **meine Familie**, deren finanzielle und vor allem moralische Unterstützung für mich unschätzbar wertvoll ist. Besonders danke ich hier auch meinem Bruder **Thomas** für das Korrekturlesen der Arbeit.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Stephan Rehm
Geburtsdatum: 16. April 1976
Geburtsort: Würzburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig



Schulbildung

09/82 – 07/86 Grundschule Stadtmitte (Bechtolsheimer Hof) in Würzburg
09/86 – 06/95 Röntgen-Gymnasium in Würzburg

Studium

09/95 – 03/00 Studium der Chemie an der Julius Maximilian-Universität in Würzburg
04/99 Vordiplomsprüfung
04/00 – 03/02 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität in Bochum
04/02 – 09/02 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfram Sander
Thema: „Optimierung einer STEP/SCAN-Anlage zum Nachweis kurzlebiger Reaktionszwischenstufen mit Hilfe der IR-Spektroskopie“
Seit 05/03 Doktorand am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main im Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Schwalbe, Thema der Doktorarbeit: „Strukturelle Untersuchungen an Peptiden und Proteinen mit NMR- und Ultrakurzzeitspektroskopie“